

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Les complexes métallo-organiques au cuivre (II), une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Ledecq, Marie

Award date:
2004

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTE DES SCIENCES

**Les complexes métallo-organiques au cuivre (II),
une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéase du virus de
l'immunodéficience humaine de type 1**

Dissertation présentée par
MARIE LEDECQ
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du Jury :

Prof. F. Durant (Promoteur)
Prof. J. Wouters (FUNDP, Namur)
Prof. S. Vincent (FUNDP, Namur)
Prof. M. Reboud-Ravaux (Institut J. Monod, Paris)
Dr N. Gresh (Université R. Descartes, Paris)

2004

© Presses universitaires de Namur & Marie Ledecq
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique
ISBN: 2-87037-481-X
Dépôt légal: D / 2004 / 1881 / 52

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Facultés des Sciences
Rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur, Belgium

**Les complexes métallo-organiques au cuivre (II), une nouvelle famille d'inhibiteurs de la
protéase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1**

par Marie Ledecq

Résumé

La protéase du VIH-1 est une cible de choix dans le traitement du SIDA, car l'inhibition de son activité protéolytique contrecarre la réplication virale. Dans ce contexte, une approche de conception *de novo* d'inhibiteurs non peptidiques de cet enzyme, réalisée au sein de notre laboratoire, avait permis d'épingler une famille originale de complexes métallo-organiques au cuivre (II). Au cours de cette thèse, nous avons entrepris la caractérisation physico-chimique et structurale de ces composés afin d'élucider leur mode d'interaction avec la protéase, en nous appuyant sur diverses techniques expérimentales (DRX, RPE, ESI-MS) et théoriques (mécanique moléculaire, SIBFA). En particulier, nous avons montré que la stabilité thermodynamique de ces complexes en solution était indispensable à toute activité biologique. L'adaptation de la méthode SIBFA aux complexes au cuivre (II) nous a permis d'étudier les phénomènes énergétiques intervenant dans leur stabilité. Enfin, nous avons réuni les critères structuraux responsables de l'activité anti-protéolytique de ces complexes au sein d'un modèle pharmacophorique optimisé.

Metallo-organic copper(II) complexes as a new family of HIV-1 protease inhibitors

by Marie Ledecq

Abstract

HIV-1 protease is a main target for the AIDS treatment, because its inhibition blocks the viral replication. *De novo* drug design, previously conducted in our laboratory, had pointed out several copper (II) chelates as a new family of non peptidic protease inhibitors. In order to provide a better understanding of their structure-activity relationships, we performed the physico-chemical characterization of these compounds using experimental (XRD, EPR, ESI-MS) and theoretical (molecular mechanics, SIBFA method) techniques. We demonstrated that the thermodynamic stability of the complexes is an essential property to provide inhibitory activity. The SIBFA procedure adapted to copper (II) complexes helped us to study the energetics involved in the stability process. From our results, we derived a pharmacophore model describing the structural properties needed to achieve a good inhibition of the enzyme.

Dissertation doctorale en Sciences Chimiques (Ph.D. thesis in Chemistry)
16 décembre 2004 (December 16th, 2004)
Laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale (Profs F. Durant & G. Evrard)
Promoteur (Advisor) : Prof. F. Durant

*A Clara,
qu'elle aille jusqu'au bout de ses rêves...*

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ceux qui ont contribué à son élaboration.

Le Professeur François Durant m'a accueillie chaleureusement au sein de son laboratoire. Son enthousiasme, ses qualités humaines, son esprit d'ouverture m'ont encouragée à toujours aller de l'avant, quels que soient les joies et les obstacles rencontrés durant mon parcours.

Le Professeur Guy Evrard, dont la gentillesse et la prévenance sont à souligner, m'a introduite aux techniques cristallographiques. J'y associe naturellement l'expertise de Johan Wouters et de Bernadette Norberg.

Cette thèse n'existerait pas sans le travail rigoureux et créatif effectué par le Docteur Florence Lebon. Florence (my boss) m'a initiée aux techniques du drug design et m'a fait découvrir les subtilités du fonctionnement de cette petite protéase. Mais avant tout, c'est son amitié sans faille qui m'a été la plus précieuse durant toutes ces années.

C'est dans le cadre d'une collaboration fructueuse avec les laboratoires des Professeurs Michèle Reboud-Ravaux, Olivier Kahn, Sames Sicsic et Hans J. Schramm que les molécules présentées dans cet ouvrage ont été synthétisées et testées. Cette thèse a vu le jour grâce au travail préalable d'Eve de Rosny, de Nicole Boggetto, de Zohra Benatalah et de René Lapouyade. Je garderai en mémoire nos réunions européennes si enrichissantes.

Par la suite, de nouvelles collaborations ont été nouées avec les laboratoires des Professeurs José Remacle et Ginette Deby-Dupont. L'aide de Marc Dieu, de Catherine Demazy et d'Ange Mouithys-Mickalad a été cruciale pour mener à bien la caractérisation physico-chimique de ces complexes.

Le Docteur Nohad Gresh m'a permis de découvrir la méthode SIBFA qui m'a réellement passionnée. Le travail que nous avons réalisé ensemble, avec l'aide précieuse du Docteur Claude Giesner-Prettre, reste un des moments les plus déterminants de cette thèse.

Les Docteurs Florence Lebon et Christine Cauvin ont accepté de faire une lecture critique de ce manuscrit. Leurs corrections ont entraîné l'aboutissement de la rédaction de cet ouvrage. J'ai également bénéficié des connaissances orthographiques de ma tante, Marie-Madeleine Glineur.

Plus concrètement, je remercie le FRIA pour son soutien financier.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées quotidiennement au laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale. Nous avons ainsi partagé, selon les occasions, connaissances scientifiques et amitié. Je salue ici l'ancienne génération : parmi eux, Flo, Audrey, Géra, Paola, Nicole, Johan, Luc, Fred, Gaétan M., Sandro, Gaétan H., Nicolas et la nouvelle : Kiki, Catherine, Bernadette, Raph et Caro (et le petit Lucas), Jérôme, ... Il m'est impossible de résumer ici tous ces moments particuliers que nous avons passés ensemble, mais c'est grâce à eux que je n'ai jamais regretté d'avoir entamé ce travail de longue haleine.

Ces dernières années, le travail didactique a occupé une part importante de mes journées. Plus particulièrement, j'ai apprécié encadrer les travaux pratiques de première licence avec Valérie Norberg et Laurence Leherte, sans oublier bien sûr l'indispensable aide de Bernadette Norberg.

D'autres amitiés ont éclairé mon parcours aux Facultés. Parmi elles, je citerai celle que m'a accordée Fabienne Debuigne depuis la première candi, et plus récemment celle de Valérie Wathelet pour ses encouragements quotidiens lors de la rédaction de cette thèse.

C'est à ma famille et à mes amies Virginie et Barbara que je dois d'être celle que je suis aujourd'hui. Leur amour et leur amitié me construisent et me soutiennent depuis l'enfance. Marco et Clara, mes deux amours, m'entraînent maintenant vers l'avenir.

Enfin, je remercie les Professeurs Michèle Reboud-Ravaux, Stéphane Vincent, Johan Wouters ainsi que le Docteur Nohad Gresh qui ont aimablement accepté d'être membres de ce jury.

I.	INTRODUCTION GENERALE	1
0.	Préambule	1
1.	Le Virus de l'Immunodéficience Humaine	1
1.1.	<i>Le SIDA, Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise</i>	1
1.2.	<i>Le VIH-1, un rétrovirus très efficace</i>	4
1.3.	<i>Les approches thérapeutiques actuelles, un succès mitigé</i>	13
2.	La protéase du virus de l'immunodéficience humaine	22
2.1.	<i>La protéase du VIH-1, un enzyme particulièrement bien décrit</i>	22
	... appartenant à la famille des protéinases à acides aspartiques	22
	...possédant une structure tridimensionnelle largement caractérisée	25
	...fonctionnant selon un mécanisme de catalyse acide-base typique	32
2.2.	<i>Les stratégies de conception d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1, un panel varié représentatif du 'drug design' actuel</i>	34
	...s'appuyant sur les principes de la cinétique enzymatique	34
	...dirigées contre le site actif	36
	...visant l'interface de dimérisation	58
	...perturbant la structuration de l'enzyme	63
3.	La conception <i>de novo</i> d'une famille originale d'anti-protéases	68
3.1.	<i>Le pharmacophore, première étape d'une conception rationnelle</i>	68
3.2.	<i>L'identification d'un complexe métallo-organique, chef de file d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1</i>	71
4.	La chimie bio-inorganique au service de la médecine	74
4.1.	<i>La chimie bio-inorganique, une discipline en pleine expansion</i>	74
	... étudiant l'influence des métaux dans les processus biologiques	74
	... pointant le cuivre comme élément essentiel à la vie	75
4.2.	<i>L'utilisation des métaux en médecine, une approche originale et fructueuse</i>	79
	... allant du traitement du cancer aux agents de contraste	79
	... permettant des applications thérapeutiques au cuivre	84

II.	OBJECTIFS ET STRATEGIES	89
III.	MATERIEL ET METHODES	95
1.	Méthodes expérimentales	95
1.1.	<i>La diffraction des rayons X, méthode de caractérisation des complexes à l'état cristallin</i>	95
1.2.	<i>La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray, moyen d'appréhender un mode de complexation en solution</i>	99
1.3.	<i>La résonance paramagnétique électronique, technique dédiée à la caractérisation des complexes au cuivre(II)</i>	102
2.	Méthodes théoriques	105
2.1.	<i>La mécanique quantique, permettant la détermination des propriétés électroniques des ligands</i>	105
2.2.	<i>La mécanique moléculaire, outil de modélisation de l'interaction inhibiteur/protéase</i>	108
2.3	<i>La méthode SIBFA, particulièrement adaptée à l'étude des espèces métalliques</i>	114
IV.	RESULTATS	119
1.	Caractérisation structurale de complexes au cuivre (II) à l'état cristallin Hypothèses d'interaction avec la protéase du VIH-1	119
1.1.	<i>La structure des complexes C0-C4 à l'état cristallin, point de départ de l'interprétation des données d'activité anti-enzymatique</i>	120
	... le cristal, lieu d'interactions moléculaires	120
	... la structure cristallographique des complexes C01 et C02	123
	... la structure cristallographique du complexe C1	134
	... la structure cristallographique des complexes C2 et C4, ainsi que du ligand L3	142
	... l'effet Jahn-Teller, caractéristique des complexes au cuivre (II)	148

1.2.	<i>Les relations entre la structure et l'activité des complexes C0-C4, tentative de rationalisation de l'interaction inhibiteur/protéase</i>	154
	... les modèles d'interaction basés sur la structure cristallographique	154
	... la modélisation moléculaire des complexes C0-C4 / protéase	160
	... la comparaison aux inhibiteurs peptidomimétiques	174
1.3.	<i>Conclusion</i>	183
2.	Caractérisation structurale de complexes au cuivre(II) en solution	
	Influence de la stabilité des complexes sur leur activité inhibitrice	186
2.1.	<i>La détermination par spectrométrie de masse des espèces présentes en solution</i>	187
	... la caractérisation structurale de SETCEZ et des complexes C0	187
	... l'étude comparative des complexes C1-C4	191
2.2.	<i>L'évaluation par résonance paramagnétique électronique de la persistance des complexes dans les conditions des tests enzymatiques</i>	199
	... l'influence du solvant sur la stabilité des complexes	199
	... la confrontation aux données biologiques	204
2.3.	<i>Conclusion</i>	207
	... les apports d'une caractérisation structurale en solution	207
	... la stabilité des complexes, une propriété incontournable	209
3.	Evaluation théorique des propriétés énergétiques de complexes au cuivre (II) par la méthode SIBFA	214
3.1.	<i>La modélisation des complexes au cuivre (II) par la méthode SIBFA</i>	216
	... l'adaptation de la procédure aux complexes au cuivre(II)	217
	... l'analyse structurale des complexes C1 et C2	222
3.2.	<i>Les propriétés énergétiques des complexes C1, C2 et de leurs dérivés</i>	227
	... l'étude de la stabilité relative de C1 et C2 en présence d'acétate	227
	... l'influence de la structure des ligands sur la stabilité des complexes	230
3.3.	<i>Conclusion</i>	239
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	243
VI.	BIBLIOGRAPHIE	263
VII.	ANNEXES	317

Préambule

Tout au long de ce manuscrit, nous vous décrivons la caractérisation en vue du développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de type métallo-organique dirigés contre la protéase du virus de l'immunodéficience humaine. Dans un premier temps, cette introduction générale nous permettra d'aborder le contexte de ce travail en répondant à deux questions fondamentales : *pourquoi* choisir d'étudier de nouvelles familles d'inhibiteurs de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine et *comment* y arriver.

Le point 1 décrira le virus, son mode d'action ainsi que l'arsenal thérapeutique existant à l'heure actuelle. Au travers de ces quelques paragraphes, nous comprendrons qu'il est toujours urgent de mettre au point de nouveaux médicaments anti-viraux. Le point 2 s'attardera sur la protéase et les différentes approches thérapeutiques dont elle a fait l'objet. Nous verrons que cet enzyme extrêmement bien caractérisé est une cible idéale pour développer de nouvelles stratégies de conception de médicaments. Le point 3 montrera que ce travail s'inscrit dans un projet plus ancien initié au sein du Laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale, projet qui a permis de découvrir une famille originale d'inhibiteurs métallo-organiques. Ce type de molécule est étudié dans le contexte d'une discipline passionnante, au succès de plus en plus affirmé : la chimie bio-inorganique développée au point 4.

1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1.1. *Le SIDA, Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise*

Au début de l'été 1981, deux rapports du Centre de Contrôle des Maladies d'Atlanta (Center for Diseases Control, CDC) recensèrent l'apparition simultanée de plusieurs cas de maladies extrêmement rares : une pneumonie induite par un protozoaire, le *Pneumocystis carinii* ainsi que le sarcome de Kaposi^{1,2} affectant de jeunes homosexuels californiens. L'association atypique de ces deux maladies qui,

jusqu'alors, ne touchaient que des sujets âgés ou sous thérapie immunosuppressive, fit postuler l'apparition d'un nouveau syndrome caractérisé par un état immunodéprimé. Cet état immunodéprimé est dû à un déficit en lymphocytes T4 qui assurent la régulation de la réponse immunitaire, ouvrant ainsi la voie à toute une série d'agents pathogènes qu'un système immunitaire sain contrôle facilement : les maladies opportunistes. Le nouveau syndrome fut appelé SIDA, Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise. Au même moment, en France, les Professeurs Rozenbaum, Leibowitch et Mayau étaient confrontés à des patients présentant des symptômes similaires. Il s'agissait, pour la plupart, de personnes ayant résidé en Afrique³. En quelques mois, les cas se multiplièrent, laissant présager une épidémie internationale de grande ampleur qui n'épargnait ni les hétérosexuels, ni les femmes, ni les enfants.

On établit rapidement l'origine virale de cette maladie infectieuse se transmettant par voie sanguine ou sexuelle. En 1983, les équipes française du Professeur Montagnier⁴ et américaine du Professeur Gallo⁵ isolèrent simultanément l'agent pathogène du SIDA : le Virus de l'ImmunoDéfiance Humaine, ou VIH-1. On découvrit par la suite qu'il existe plusieurs souches virales de virulence variable. Parmi elles, le VIH-2 touche principalement les populations d'Afrique de l'Ouest. Il semble moins pathogène et mène plus lentement au SIDA⁶. On pense actuellement que l'épidémie a commencé en Afrique bien avant les années 80 par la transmission à l'homme du VIS, virus de l'ImmunoDéfiance Simienne touchant les populations de chimpanzés et de mangabeys⁷.

La communauté scientifique se mobilisa très rapidement pour trouver des moyens de lutter contre l'épidémie. Au début des années 80, une prévention efficace, notamment dans la communauté homosexuelle californienne, permit de limiter l'apparition de nouveaux cas de SIDA. Parallèlement, la compréhension des mécanismes de réplication du virus orientèrent les efforts vers la conception d'inhibiteurs de deux enzymes viraux : la transcriptase inverse et la protéase. Ainsi, l'homologation de l'AZT, en 1987, ouvrit l'ère des thérapies anti-VIH. Quelques années plus tard, l'apparition d'une nouvelle classe de médicaments, les antiprotéases, puis leur utilisation conjointe avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse permit de faire chuter le nombre de décès de plus de 60 %, entre 1994 et 1997⁸ (Figure 1.1.). De grands espoirs furent placés dans ces multithérapies, laissant même penser que le SIDA pourrait dorénavant être traité comme une maladie chronique, telle que le diabète ou l'hypertension⁹.

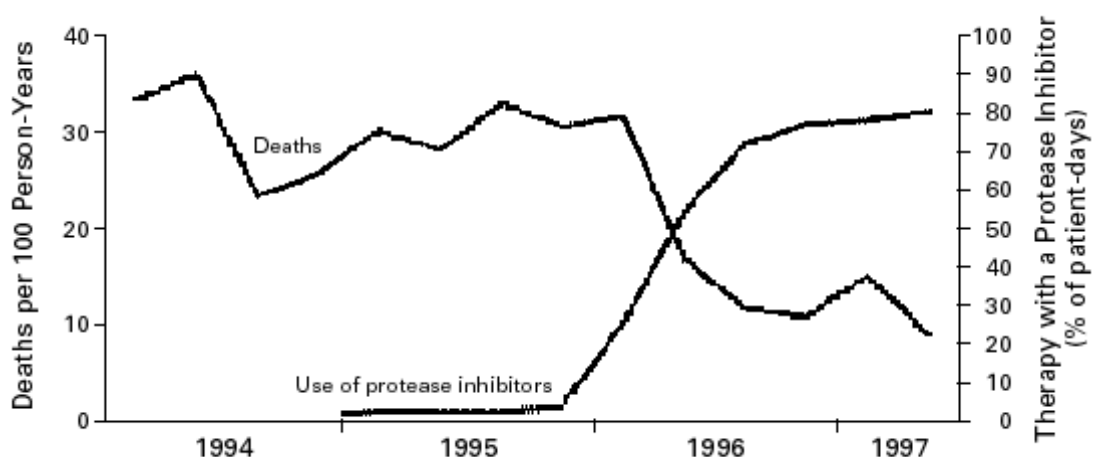


Figure 1.1. Mortalité et fréquence d'utilisation d'une multithérapie incluant un inhibiteur de protéase parmi les patients infectés par le VIH ⁸.

Actuellement, l'enthousiasme initial est retombé. Même si les multithérapies, appelées aujourd'hui HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapies), ont considérablement amélioré le quotidien et prolongé la survie de la plupart des patients, elles n'ont néanmoins pas permis d'éradiquer le virus. En effet, l'efficacité des médicaments est rapidement contrecarrée par l'apparition de souches mutantes du virus résistantes aux traitements ; des effets secondaires à court et à long terme sont fréquents et l'interruption du traitement entraîne une recrudescence de la virulence de la maladie. De plus, l'annonce médiatique de la découverte de nouvelles thérapies plus efficaces a affaibli le travail de prévention, entraînant une résurgence des comportements à risque. Dans nos sociétés industrialisées, l'épidémie continue à progresser, lentement mais sûrement... Ainsi, on recense, en Belgique, à l'heure actuelle, une moyenne de trois infections par jour. Vingt ans après le début du combat contre le VIH, les résultats se marquent donc chez nous en demi-teintes ^{10,11}.

Dans le reste du monde, il en va tout autrement, comme en témoignent ces quelques chiffres ^{10,12}. Globalement, 40 millions de personnes sont atteintes du VIH dans le monde ; l'épidémie a déjà fait 20 millions de morts et 750 mille bébés naissent infectés chaque année. Parmi les 40 millions de personnes touchées, 28.5 millions vivent en Afrique sub-saharienne, 5.6 millions en Asie du sud et du sud-est, et un million en Europe de l'est et en Asie centrale ¹³⁻¹⁵. La Chine, l'Inde et la Russie vivent une progression fulgurante de l'épidémie ¹⁶.

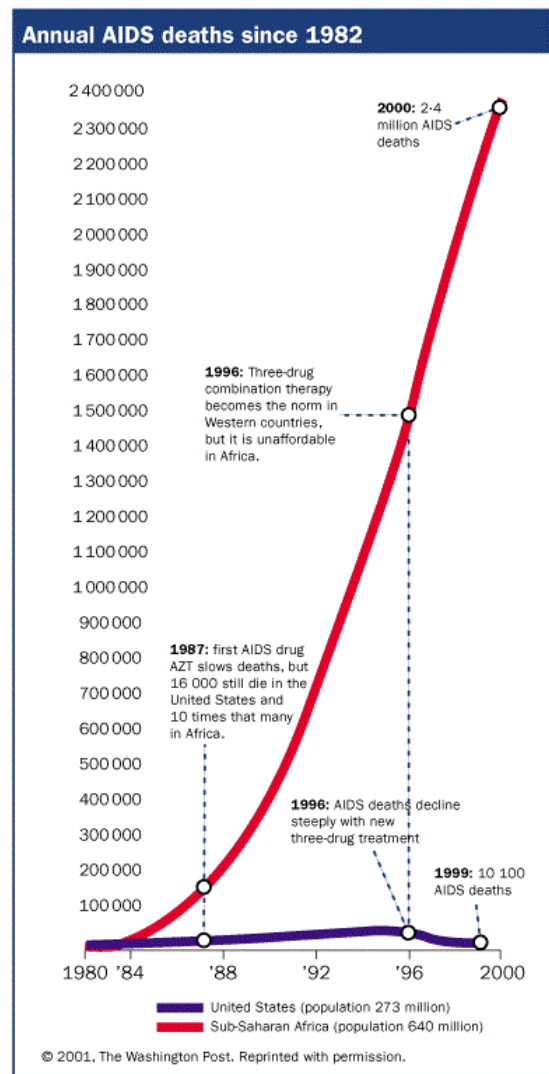


Figure 1.2. Nombre de décès dus au SIDA aux Etats-Unis et en Afrique subsaharienne depuis 1980 ⁷³⁶.

Mais c'est en Afrique que la situation dépasse ce que les pires scénarios catastrophes prédisaient il y a quelques années¹⁷. Ce continent n'a accès à aucun des traitements disponibles aujourd'hui et comptabilise plus de 80% des décès dus au SIDA (Figure 1.2.). Dans certains pays d'Afrique du Sud, comme le Botswana, le Lesotho ou le Zimbabwe, plus d'un tiers de la population est touché par le virus ; on prévoit que l'espérance de vie tombera de 60 ans en 1990, à 30 ans en 2010 ¹⁸ et qu'un adolescent de 15 ans aujourd'hui n'aura sans doute guère plus d'une chance sur dix d'échapper au virus¹⁹. Les conséquences sociales et économiques sont évidemment dramatiques puisque c'est la tranche de la population la plus active qui est décimée. Il en résulte un appauvrissement général, un accès à l'éducation et aux soins diminué, une insécurité croissante^{18,19}. Il ne fait aucun doute qu'il est vital d'aider ces pays à avoir accès à des politiques de prévention efficaces mais surtout aux soins et aux thérapies disponibles aujourd'hui ^{3,13,20}.

1.2 Le VIH-1, un rétrovirus très efficace

Dès 1982, R. Gallo émet l'hypothèse qu'un rétrovirus humain était à l'origine des manifestations du SIDA. Ce chercheur avait, deux ans plus tôt, montré que les rétrovirus peuvent s'attaquer à l'homme en isolant le HTLV (Human T-cell Leukemia Virus), un virus ciblant lui aussi le système immunitaire et induisant des leucémies

chez les personnes infectées²¹. Les rétrovirus ont la particularité d'avoir un génome constitué d'ARN et non d'ADN, comme la plupart des organismes vivants. Pour intégrer son matériel génétique à celui de la cellule hôte, et ainsi détourner la machinerie cellulaire à son profit, il doit au préalable être transcrit en ADN. A cette fin, il dispose d'un enzyme qui lui est propre, la transcriptase inverse, dont nous reparlerons plus loin.

Le VIH fait en outre partie de la famille des lentivirus car les symptômes du SIDA n'apparaissent qu'après une assez longue période d'incubation²². En effet, le virus se propage d'une personne à une autre, généralement lors des relations sexuelles, par exposition directe à du sang contaminé ou par transmission de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou de l'allaitement. Une fois dans l'organisme, le VIH envahit certaines cellules immunitaires comme les lymphocytes T4 ou les macrophages, qui possèdent sur leur surface des récepteurs CD4 (d'où leur nom : cellules CD4+).

Au début de l'infection, le virus se multiplie rapidement : la concentration en particules virales augmente dans le sang, tandis que de nombreuses cellules CD4+ sont rapidement détruites. Cette destruction est due au bourgeonnement massif de nouveaux virions, qui endommage considérablement la membrane de la cellule infectée²³, et aux attaques des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent une agression extérieure²⁴. La formation de syncytia, résultant de la fusion de plusieurs cellules^{*25}, et la capacité du VIH à provoquer l'apoptose^{**} chez certaines cellules voisines d'une cellule infectée²⁴ contribuent également à l'affaiblissement des défenses immunitaires. Après trois semaines environ de cette phase aiguë, de nombreuses personnes ont des symptômes qui évoquent une mononucléose.

Ces signes disparaissent en moins de trois semaines, lorsque le système immunitaire reprend le dessus en limitant le nombre de particules virales dans le sang. Cette activité protectrice intense n'élimine cependant pas tous les virus. Six mois environ après la contamination, un équilibre s'établit entre la réplication virale et la réponse du système immunitaire. Il s'écoule en moyenne entre huit et dix ans avant que les complications graves du SIDA n'apparaissent. Pendant cette phase chronique prolongée, les personnes séropositives sont apparemment en bonne santé car leur

* Lorsqu'une cellule infectée exprime les protéines d'enveloppe du VIH sur sa surface, elle peut reconnaître les récepteurs CD4 d'une cellule voisine et fusionner avec elle, provoquant ainsi sa contamination et la formation d'une cellule géante polynucléaire appelée syncytium.

** Apoptose : terme désignant la destruction programmée d'une cellule.

concentration en cellules CD4+ reste suffisante pour que le système de défense réagisse aux autres agents pathogènes.

Cette concentration diminue néanmoins progressivement. Lorsqu'elle devient inférieure à environ 200 cellules CD4+ par millimètre cube de sang, le SIDA apparaît. La concentration en particules virales augmente alors rapidement, et les micro-organismes que le système immunitaire tient normalement en échec prolifèrent, déclenchant des infections opportunistes potentiellement mortelles, comme les pneumonies à *Pneumocystis Carinii*, le syndrome de Kaposi, la toxoplasmose ou certaines formes de démence. Lorsque ces maladies apparaissent, le malade meurt en un ou deux ans (Figure 1.3.)^{26,27}.

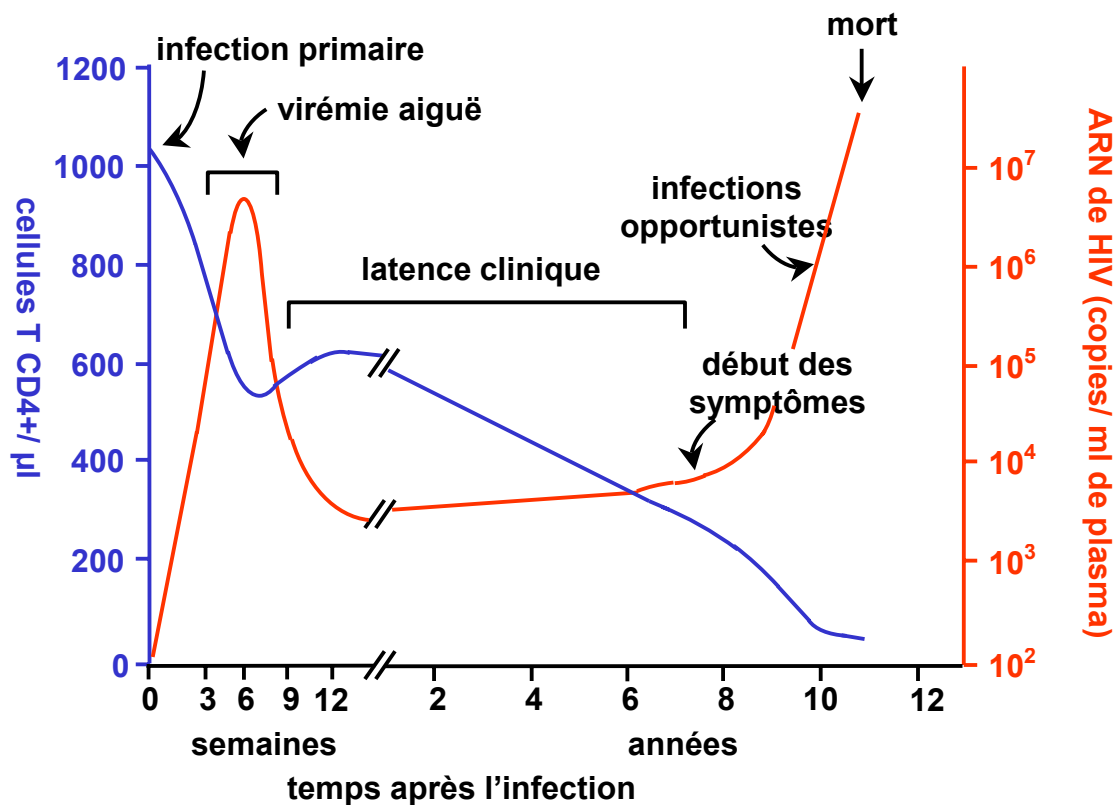


Figure 1.3. Evolution, au cours du temps, de la charge virale d'un patient et de son taux de cellules CD4+²⁷.

Les particules de VIH-1 se présentent sous une forme sphérique dont le diamètre varie entre 1000 et 3000 Å²⁸. Le virus mature dispose d'une membrane formée d'une bicouche lipidique criblée de glycoprotéines de surface (SU, ou gp120) et traversée par des glycoprotéines dites transmembranaires (TM, ou gp41). Ancrées

sous la membrane, les protéines de matrice (MA, ou p17) forment une sous-couche. Les protéines de capsid (CA, ou p24) délimitent le cœur du virus, en forme de cône. Celui-ci renferme les deux brins d'ARN génomiques recouverts par les protéines de nucléocapside (NC, ou p7). Outre ces protéines de structure, le virus contient les enzymes viraux nécessaires à sa réplication : la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). D'autres protéines virales (p6, Tat, Rev, Vif, Nef, Vpr et Vpu) et cellulaires (MHC, actine, cyclophiline A, ...) sont présentes en moindre quantité (Figure 1.4.).

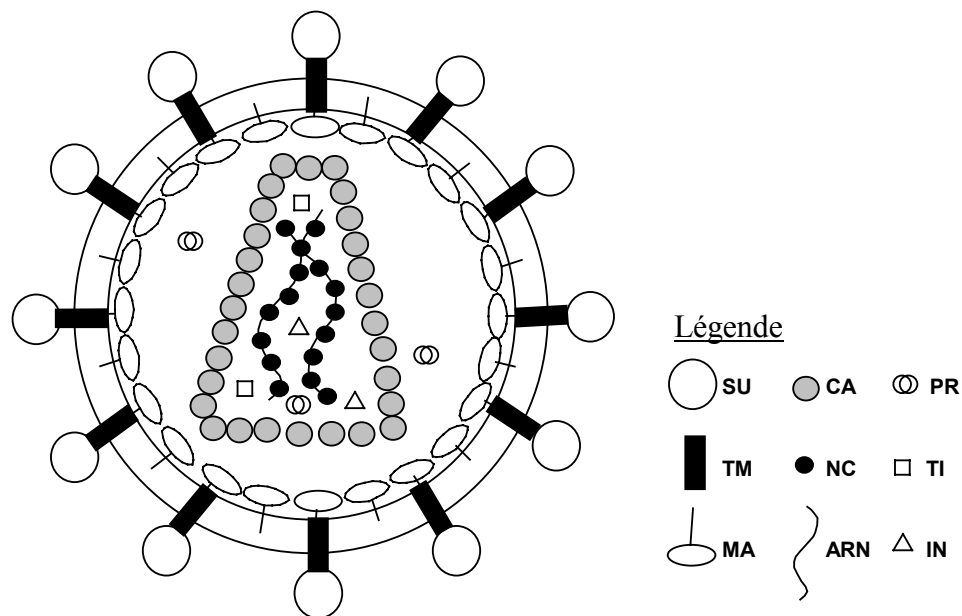


Figure 1.4. Représentation schématique du VIH.

Le génome du VIH-1^{29,30} est constitué de trois gènes principaux, communs à tous les rétrovirus : le gène *gag* (pour Group-specific AntiGen) codant pour les protéines de matrice, de capsid, de nucléocapside et pour la protéine p6 ; le gène *pol* (pour POLymérase) codant pour les enzymes viraux, la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase ; le gène *env* (pour ENVeloppe) codant pour les protéines d'enveloppe, les glycoprotéines transmembranaires et de surface. En outre, on trouve six gènes supplémentaires codant pour des protéines dites accessoires et assurant différents rôles de régulation : Tat, Rev, Vif, Nef, Vpu et Vpr. Ces neuf gènes sont classiquement encadrés par deux séquences appelées LTR, Longues Répétitions Terminales, qui permettent d'activer les enzymes de la cellule hôte et d'amorcer le

phénomène de traduction de l'ADN proviral intégré dans le génome cellulaire en ARN (Figure 1.5).

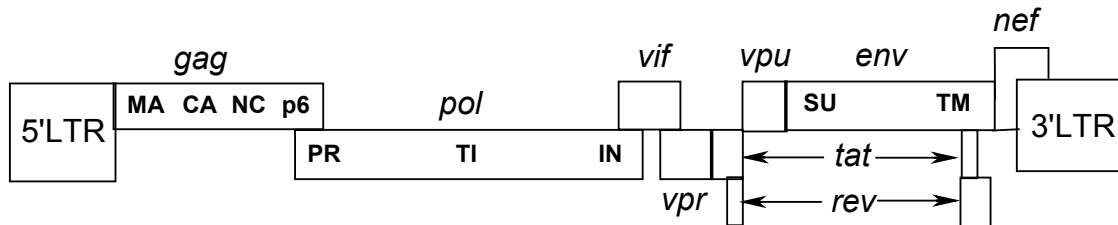


Figure 1.5. Organisation du génome du VIH-1.

Toutes ces protéines assurent différents rôles dans le cycle de réplication du virus, que l'on peut décomposer en huit étapes principales³¹, reprises à la figure 1.6.

I. Reconnaissance et pénétration³²

Le VIH infecte les cellules exprimant simultanément à leur surface des récepteurs CD4 ainsi que certains récepteurs à chimiokines. Les principaux récepteurs à chimiokines reconnus par le virus sont les récepteurs CCR5 exprimés par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T activés, et les récepteurs CXCR4 exprimés par les autres lymphocytes T. Les deux glycoprotéines virales d'enveloppe, gp120 et gp41, toutes deux associées sous forme de trimères, ont chacune des rôles spécifiques dans la liaison et la fusion à la cellule hôte. Dans un premier temps, **gp120** se lie aux récepteurs CD4, ce qui entraîne des changements conformationnels au sein des deux protéines d'enveloppe. Le domaine de liaison aux récepteurs à chimiokines est alors

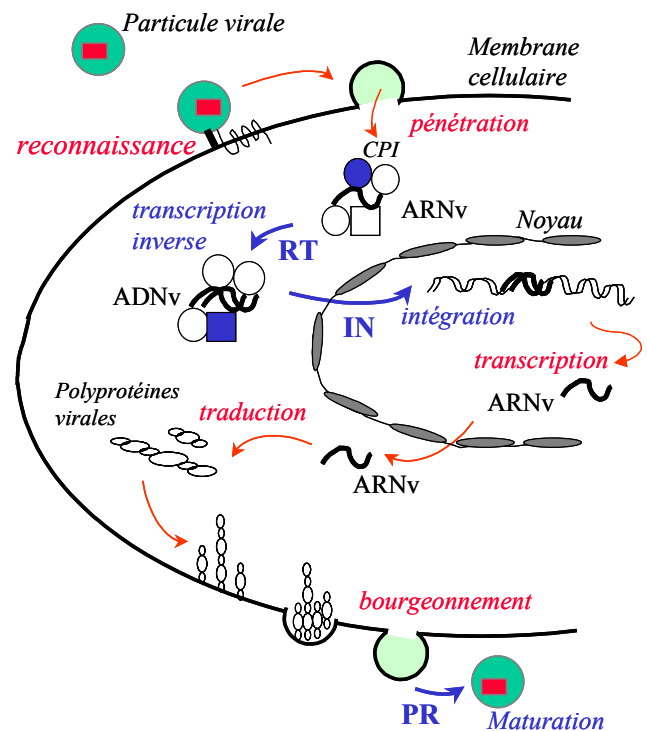


Figure 1.6. Cycle de réplication du VIH-1.

exposé à la surface de gp120 permettant la liaison à ce deuxième type de récepteur. De nouveaux changements conformationnels libèrent ensuite l'extrémité N terminale hydrophobe de **gp41** que l'on appelle peptide de fusion. Il s'insère en effet dans la membrane de la cellule hôte entraînant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire. La capside pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les protéines de **capside** se désolidarisent pour s'associer avec une protéine cellulaire, la cyclophiline A, et libèrent ainsi le contenu du cœur du virus.

II. Transcription inverse

Après la pénétration du virus dans la cellule hôte, un complexe nucléoprotéique se forme, comprenant l'ARN viral ainsi que les protéines de matrice et de nucléocapside, l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéine Vpr. On appelle cet ensemble Complexe de PréIntégration (CPI) car il va accompagner le matériel génétique du virus depuis son entrée dans le cytoplasme jusqu'au noyau où il sera intégré dans un chromosome cellulaire^{33,34}. Au sein de ce complexe de préintégration va se dérouler une étape cruciale du cycle de réplication : la transcription inverse qui caractérise les rétrovirus. En effet, l'ARN viral doit être converti en un double brin d'ADN afin d'être intégré dans le génome cellulaire. Cette conversion est catalysée par la **transcriptase inverse**³⁵ qui possède trois fonctions enzymatiques : dans un premier temps, l'activité polymérase ARN-ADN permet de copier la matrice d'ARN en ADN ; ensuite l'activité ribonucléase H (Rnase H) dégrade la matrice d'ARN après sa transcription ; enfin l'activité polymérase ADN-ADN fabrique une seconde copie d'ADN à partir du premier brin obtenu. Ce double brin d'ADN viral peut dès lors être intégré dans le génome cellulaire. Les protéines de **nucléocapside**, liées à l'ARN viral, secondent la transcriptase inverse en stimulant l'initiation du processus de transcription inverse³⁶. Ce processus implique également la protéine virale **Vif**, qui permet de protéger le matériel génétique viral des attaques de certaines protéines cellulaires³⁷⁻⁴². Notons, en outre, que la transcriptase inverse ne possède pas d'activité correctrice, ce qui entraîne un taux de mutation fort élevé lors de la transcription de l'ARN en ADN. Cependant, on pense que la protéine virale **Vpr**⁴³ rétablit une certaine fidélité à la réplication du génome viral en recrutant au sein du CPI un enzyme cellulaire spécialisé dans la réparation des erreurs de transcription dans l'ADN.

III. Transport vers le noyau

Le CPI incluant le génome viral sous forme d'un double brin d'ADN migre vers le noyau de la cellule⁴⁴. Deux mécanismes permettent d'atteindre les chromosomes cellulaires. D'une part, dans les cellules entrant en division lors de la mitose, la membrane nucléaire disparaît et ouvre ainsi le passage au CPI. D'autre part, le VIH est capable de se répliquer au sein de cellules au repos, comme les macrophages. En effet, un mécanisme de transport actif (nécessitant de l'énergie) permet au CPI de pénétrer dans le noyau : le CPI se lie à une protéine cellulaire appartenant à la famille des karyophérines α *via* une séquence basique appelée NLS (Nuclear Localization Signal) que l'on retrouve à la fois sur la protéine de **matrice**⁴⁵ et l'**intégrase**⁴⁶. La liaison de la protéine **Vpr** à un deuxième site de la karyophérine α est également indispensable, car elle augmente l'affinité de celle-ci pour le NLS de la protéine de matrice ou de l'intégrase⁴⁷. La karyophérine α forme un hétérodimère avec la karyophérine β ⁴⁸. Cette dernière dirige le CPI à l'intérieur du complexe protéique formant les pores de la membrane nucléaire. Enfin, d'autres protéines cellulaires catalysent la séparation du CPI et de l'hétérodimère karyophérine α/β , le libérant ainsi à l'intérieur du noyau. Parmi les rétrovirus, seule la famille des lentivirus à laquelle appartient le VIH, possède cette capacité de traverser la membrane nucléaire de la cellule hôte en dehors des phases de mitose.

IV. Intégration⁴⁹

Le processus d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire est catalysé par l'**intégrase**. Cet enzyme clive deux nucléotides aux extrémités 3' de l'ADN viral, rendant ainsi accessibles deux groupements hydroxyles. L'intégrase catalyse ensuite leur réaction avec l'ADN cellulaire, ce qui initie l'intégration. Les étapes suivantes, vraisemblablement prises en charge par des enzymes cellulaires, comprennent le clivage des extrémités 5' de l'ADN viral et le lien final à l'ADN de la cellule hôte. Dès lors, l'ADN proviral se multiplie en même temps que les gènes de la cellule infectée, à chaque division cellulaire. On rapporte également que les protéines de **nucléocapside** pourraient stimuler le processus d'intégration⁵⁰.

V. Transcription et transfert de l'ARNm dans le cytoplasme

La production de nouvelles particules virales débute lorsque l'ARN polymérase de la cellule infectée transcrit l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire. Cette

transcription de l'ADN viral en ARN est régulée par des facteurs de transcription cellulaires mais aussi par la protéine virale **Tat**^{43,51,52}. En effet, lorsque ces facteurs sont en concentration suffisante dans la cellule, la transcription commence. Sur l'extrémité 5' de l'ARN produit se situe une séquence appelée TAR. La protéine Tat s'y lie de même qu'une protéine cellulaire, la cycline T. Ce complexe recrute à son tour une kinase cellulaire qui phosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN polymérase responsable de la transcription. Cette phosphorylation augmente alors fortement le taux de transcription. La protéine virale **Nef** interagirait avec Tat dans ce processus d'activation de la réplication⁵³.

Au terme de ce processus, certains brins d'ARN formeront le matériel génétique d'une nouvelle génération de virus, tandis que d'autres, désignés sous le terme d'ARN messagers, seront destinés à être traduits en précurseurs polyprotéiques par la machinerie cellulaire. Cet ARN doit être auparavant exporté dans le cytoplasme. Le fonctionnement cellulaire habituel exige qu'il soit au préalable épissé, c'est-à-dire débarrassé de ses séquences nucléosidiques non codantes. Dans le cas du VIH, l'ARN destiné à former le génome de la nouvelle génération de virus doit cependant rester intact et donc conserver ses parties non codantes. La protéine virale **Rev**⁵¹ permet l'exportation vers le cytoplasme de l'ARN non épissé. Elle se lie d'une part au domaine RRE localisé au niveau du gène *env* dans l'ARN viral, et d'autre part à une protéine cellulaire de la famille des karyophérines qui permet au complexe de traverser le pore nucléaire vers le cytoplasme.

VI. Traduction

Dans le cytoplasme, la machinerie cellulaire traduit l'ARN messager en deux types de précurseurs polyprotéiques : la polyprotéine Pr55^{gag} codée par le gène *gag* et contenant les protéines de structure et la polyprotéine Pr160^{gag-pol} provenant une fois sur vingt de la fusion des produits des gènes *gag* et *pol* et contenant en plus des protéines de structure, les trois enzymes viraux. La protéine de **matrice**, située à l'extrémité N terminale de Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} joue ici un rôle important⁵⁴. En effet, aidée par la protéine cellulaire chaperon HP68⁵⁵, elle va permettre la migration des deux polyprotéines vers la périphérie de la cellule et leur ancrage dans la face interne de la membrane cellulaire. Parallèlement, l'ARN messager correspondant au gène *env* est pris en charge par le réticulum endoplasmique à sa sortie du noyau. Il y est traduit, en même temps que les récepteurs cellulaires CD4, en un troisième précurseur polyprotéique gp160^{env}. Pour éviter les interactions CD4/gp160^{env}, la protéine virale

Vpu dégrade les récepteurs CD4 et permet donc à gp160^{env} d'être transporté à la surface de la cellule⁵⁶⁻⁵⁸.

VII. Bourgeonnement

Au fur et à mesure de leur synthèse, les différentes polyprotéines se concentrent et s'ancrent à la surface de la cellule. L'incorporation de la polyprotéine gp160^{env} au sein de la membrane cellulaire est facilitée par la protéine virale **Nef**^{51,59}. Comme Vpu dans le réticulum endoplasmique, Nef dirige les récepteurs CD4 de surface vers les lysosomes où ils sont dégradés. La reconnaissance par gp160 des récepteurs CD4 de cellules voisines reste cependant possible et caractérise d'ailleurs un mode de propagation du virus et de destruction du système immunitaire. Les lymphocytes fusionnent en effet entre eux, formant une cellule géante polynucléaire non viable appelée syncytium. En outre, Nef et **Vpu** inhibent l'expression de certaines protéines cellulaires, comme les molécules MHC de classe I qui permettent d'avertir les lymphocytes T8 cytotoxiques que la cellule est infectée et doit être détruite. Cette régulation protège donc le virus du système immunitaire du malade.

Le matériel génétique viral doit également se diriger vers la périphérie cellulaire. Les protéines de **nucléocapside**, par des liaisons spécifiques et non-spécifiques à l'ARN viral, permettent le transfert à la surface de la cellule du génome viral intact⁶⁰. Lorsque environ 2000 précurseurs gag, 200 précurseurs gag-pol se réunissent autour de deux brins d'ARN viral, et que les polyprotéines gp160 sont incorporées dans la membrane cellulaire, le nouveau virion encore immature peut bourgeonner, en emportant avec lui un morceau de la membrane lipidique cellulaire. Le bourgeonnement et la libération de la particule virale sont stimulés par les protéines virales Vpu et **p6**.

VIII. Maturation⁶¹

Le virion nouvellement constitué ne devient infectieux que lorsque les polyprotéines qui le constituent sont clivées. Les différentes protéines qui découlent de ce clivage se réorganisent en une structure mature et infectieuse (Figure 1.7.). Tandis que le clivage du précurseur gp160^{env} est assuré par des endoprotéases cellulaires⁶², celui des polyprotéines Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} est catalysée par un des trois enzymes viraux : la **protéase**, à laquelle nous nous intéresserons plus particulièrement au cours de cette thèse. L'accumulation des précurseurs polyprotéiques gag et gag-pol en

périphérie de la cellule provoque leur dimérisation²⁸. La protéase est elle-même active sous forme dimérique : elle catalyse d'abord, par hydrolyse des liaisons peptidiques appropriées, sa propre libération de la polyprotéine gag-pol puis celle des différentes protéines et enzymes viraux⁶³. Les protéines de matrice restent ancrées dans la membrane, tandis que les protéines de capsid et de nucléocapsid se structurent autour de l'ARN pour former le cœur du virus (Figure 1.4). On pense par ailleurs que l'autoclivage de la

protéase est régulé par la proximité sur gag-pol de la protéine **p6**^{64,65} et de la protéine de **nucléocapsid**⁶⁶. La protéine **Vif** jouerait également un rôle dans la maturation du VIH. Tout comme **Nef**, elle augmente le caractère infectieux du virus, dans certaines lignées cellulaires⁵¹. Enfin, le système de dégradation cellulaire protéasome/ubiquitine interviendrait lui aussi dans le processus de bourgeonnement et de clivage de la polyprotéine gag, par un mécanisme qu'il reste à élucider⁶¹.

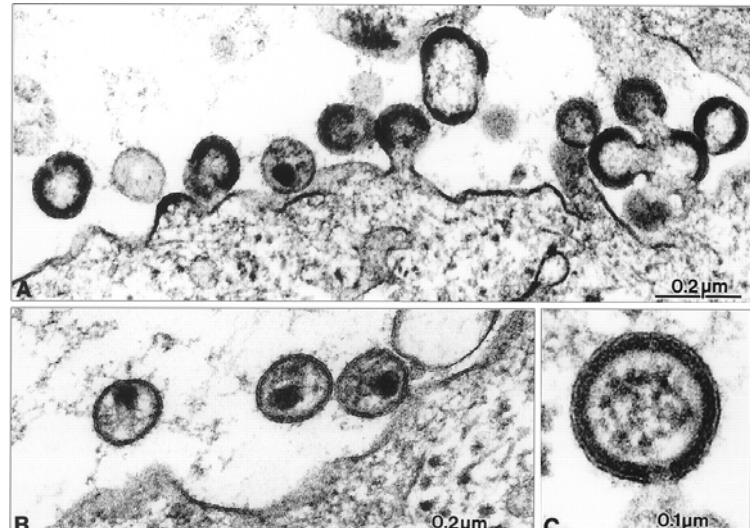


Figure 1.7. Bourgeonnement et maturation de nouvelles particules virales, observé au microscope électronique⁶¹. **A.** Vue d'ensemble du processus de bourgeonnement. **B.** Sous l'action de la protéase, le clivage des polyprotéines gag et gag-pol permet une réorganisation structurale du virion. Il devient alors infectieux. **C.** Particule virale encore immature et toujours reliée à la cellule hôte. On voit clairement la concentration des polyprotéines ancrées dans la bicouche lipidique.

1.3. Les stratégies thérapeutiques actuelles, un succès mitigé

Dès le début de l'épidémie du SIDA, la communauté scientifique internationale s'est mobilisée afin de trouver les moyens thérapeutiques susceptibles de combattre le VIH. Deux approches principales ont été envisagées : I. une connaissance de plus en plus approfondie des mécanismes de la réplication virale a permis la conception d'une petite vingtaine d'agents antiviraux, homologués par les différents organismes de contrôle officiels tel la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis ; II. le

développement d'un vaccin anti-VIH a également concentré les efforts de nombreuses équipes. On tente en effet, par une approche immunologique, d'empêcher l'infection en préparant l'organisme à une exposition au VIH ou de combattre l'infection en stimulant le système immunitaire du patient.

I. Agents antiviraux interférant au niveau de cycle de réplication^{67,68}

Les médicaments que l'on trouve aujourd'hui sur le marché bloquent le fonctionnement de deux enzymes viraux, la transcriptase inverse et la protéase (Tableau 1.1), ou empêchent la pénétration du virus à l'intérieur d'une cellule saine. Cependant, chaque étape du cycle de réplication du virus peut être considérée comme autant de cibles pour d'éventuels agents antiviraux.

Ainsi, l'**entrée** du virus dans la cellule hôte a fait l'objet de nombreuses études⁶⁹. Des composés polyanioniques, comme les polycarboxylates ou les polysulfates, ont été mis au point pour interagir avec une séquence peptidique largement positive de gp120. Ils empêchent ainsi la reconnaissance de gp120 avec les récepteurs cellulaires. Ils pourraient être utilisés comme virucide pour empêcher la transmission sexuelle du VIH⁶⁷. Plus récemment, des molécules peptidiques imitant les récepteurs CD4 ont été mises au point pour interagir avec la glycoprotéine gp120. Parmi elles, la molécule Pro-542, capable de neutraliser une large gamme d'isolat du VIH-1, est entrée en essais cliniques de Phase II.

Les antagonistes des récepteurs à chémokines CXCR4 et CCR5 représentent une autre classe d'agents antiviraux. Les composés de type bicyclam, telles que ADM 3100, sont les représentants les plus connus de cette famille. L'antagoniste du récepteur CCR5, SCH-D, possède un fort pouvoir antiviral ($EC_{50} = 0.5 \text{ nM}$) et une bonne biodisponibilité. Il agit en outre en synergie avec d'autres antiviraux commerciaux, ce qui lui vaut d'être actuellement en Phase II des essais cliniques.

Les inhibiteurs de la fusion des membranes virale et cellulaire suscitent également beaucoup d'espoirs. Le peptide synthétique T20, appelé également Enfuvirtide, Pentafuside ou Fuzeon[®], est constitué de 36 acides aminés qui interagissent avec gp41 et bloquent ainsi le processus de fusion. Très puissant et peu toxique, il représente la plus récente classe de médicaments anti-VIH disponible sur le marché. Il possède un mode d'action et un profil de résistance qui diffèrent totalement de ceux des autres antiviraux actuellement utilisés, tout en agissant en synergie avec eux. Il est donc particulièrement indiqué dans le cas de patients dont la thérapie

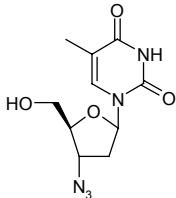
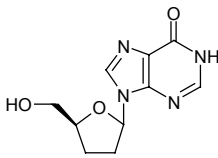
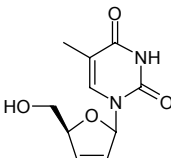
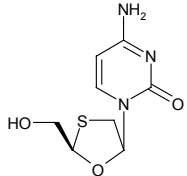
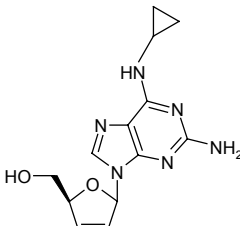
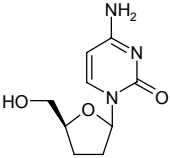
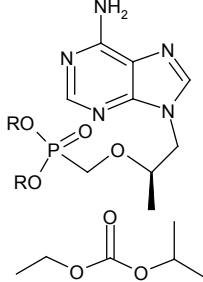
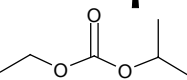
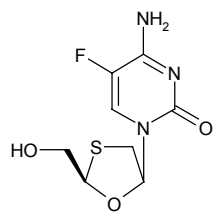
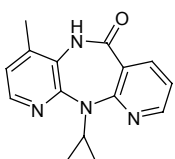
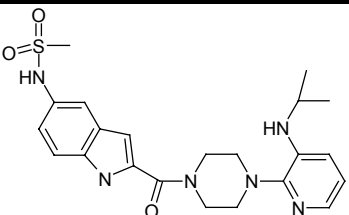
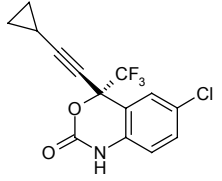
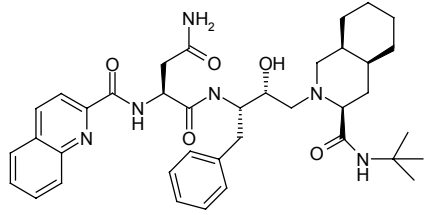
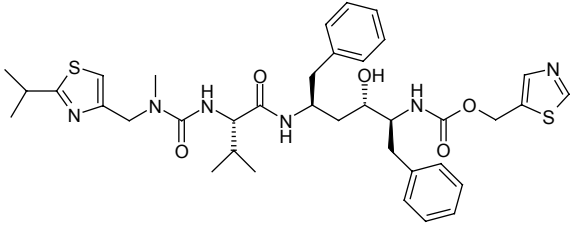
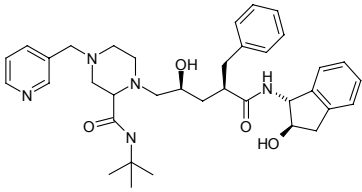
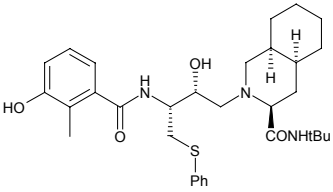
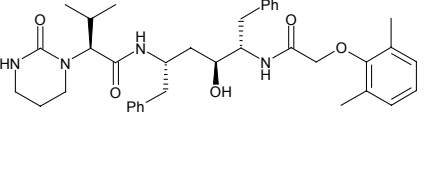
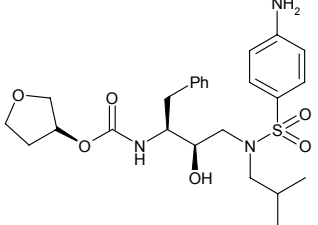
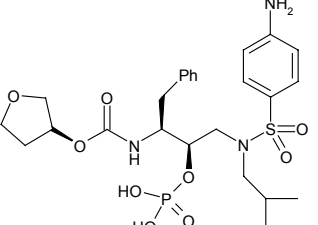
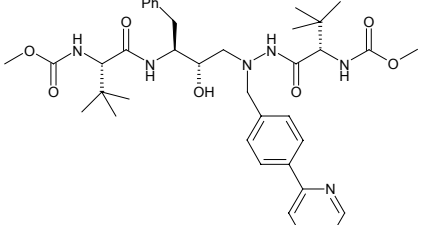
antivirale a été mise en échec par l'apparition de souches mutantes du VIH. Cependant, sa nature peptidique requiert une synthèse difficile et coûteuse, et entraîne des problèmes de biodisponibilité. La recherche se tourne dès lors vers la conception d'inhibiteurs de la fusion plus stables et de plus faibles poids moléculaires comme, par exemple, le composé ADS-J1⁶⁹.

Les inhibiteurs de la **transcription inverse** ont été les premiers à être utilisés pour contrer l'infection du VIH. Dès 1987, soit seulement cinq ans après que le virus ait été isolé, l'AZT appelé aussi Zidovudine⁷⁰, est mis à la disposition des malades. Il restera pendant quelques années le seul traitement disponible. Appartenant à la classe des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), il agit en se liant au brin d'ADN en formation, dans le site catalytique, empêchant ainsi la fixation des nucléotides naturels et l'élongation de la chaîne d'ADN. Actuellement, huit inhibiteurs nucléosidiques de la TI ont été homologués et sont repris dans le tableau 1.1. On peut noter quelques inconvénients majeurs à cette classe de médicaments. Ils provoquent pour la plupart des effets secondaires non négligeables⁷¹. Cette toxicité est due à la difficulté de concevoir des analogues nucléosidiques spécifiques, très affins pour la TI du VIH mais incapables de se lier aux polymérases cellulaires. D'autre part, ils doivent être triphosphorylés par des kinases cellulaires avant d'être incorporés à la chaîne d'ADN en formation, la première phosphorylation étant la plus délicate⁷². Pour pallier ce problème, on trouve dans les nouvelles générations d'INTI certains inhibiteurs comme le Tenofovir –un des derniers analogues nucléosidiques homologués- qui ont un groupement phosphonate déjà incorporé dans leur structure. Ces composés ne nécessitent dès lors plus que deux phosphorylations successives avant d'être actifs. Plusieurs INTI, moins toxiques et préphosphorylés, font actuellement l'objet d'essais cliniques⁶⁷.

Une deuxième classe de médicaments est également dirigée contre la transcriptase inverse. Les inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI) se fixent dans un site allostérique distinct du site actif de la transcriptase inverse. Cette interaction provoque un changement conformationnel au sein de l'enzyme, se répercutant sur les résidus catalytiques, et bloquant ainsi le processus de polymérisation. Ils ont l'avantage d'être plus spécifiques, ce qui leur confère une toxicité moins importante que celle des INTI, et ne nécessitent en outre aucune phosphorylation préalable. Un phénomène de résistance virale apparaît cependant rapidement^{*73}.

* Nous développerons le phénomène de résistance virale un peu plus loin dans ce chapitre.

Tableau 1.1. Formule chimique, dénomination commune internationale et nom commercial des médicaments approuvés à l'heure actuelle pour le traitement du SIDA et visant les enzymes viraux (INTI = inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ; INNTI = inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ; IPR =inhibiteurs de la protéase).

I N T I				
	Zidovudine Retrovir®	Didanosine Videx®	Stavudine Zerit®	Lamiduvine Epivir®
			 R = 	
	Abacavir Ziagen®	Zalcitabine Hivid®	Tenofovir Viread®	Emtricitabine Emtriva®
I N N T I				
	Nevirapine Viramune®	Delavirdine Rescriptor®	Efavirenz Sustiva®	
I P R				
	Saquinavir Inivase® (Fortovase®)		Ritonavir Norvir®	
				
	Indinavir Crixivan®	Nelfinavir Viracept®	Lopinavir Kaletra®	
				
	Amprenavir Agenerase®	Fosamprenavir Lexiva®	Atazanavir Reyataz®	

On trouve aujourd'hui plus de trente familles d'INNTI. Parmi elles, trois molécules, reprises sur le tableau 1.1., sont disponibles sur le marché ; de nombreux candidats, très puissants, actifs contre les souches résistantes du virus, et capables de franchir les différentes barrières métaboliques ont atteint les phases avancées d'essais cliniques.

L'**intégration** de l'ADN viral dans le génome cellulaire est menée à bien par l'intégrase, un des trois enzymes viraux qui, au contraire de la transcriptase inverse et de la protéase, ne possède pas d'équivalent cellulaire. L'inhibition de l'intégrase s'est rapidement présentée comme une alternative aux molécules dirigées contre la transcriptase inverse et la protéase⁷⁴. De nombreux composés ont été décrits comme ayant une activité anti-intégrase. Cependant, leur mode d'action et leur cible moléculaire réels restent ambigus. Seules quelques familles, comme celles des acides diacétiques ou des pyranodipyrimidines, visent spécifiquement l'intégrase, en empêchant la liaison de l'extrémité 3' de l'ADN viral au génome cellulaire ou en complexant des métaux indispensables au bon fonctionnement de l'enzyme^{68,75}.

L'étape de **transcription** de l'ADN viral intégré dans le matériel génétique de la cellule hôte en ARN peut également servir de cible thérapeutique. Dans cette optique, il a été montré que de nombreux composés dont certains dérivés de fluoroquinolones empêchent l'expression du provirus, notamment en inhibant le fonctionnement de la protéine virale Tat. Des analogues peptidiques de Tat ont également été conçus pour interagir avec la séquence nucléotidique provirale TAR et empêcher ainsi la formation du complexe Tat/TAR, indispensable à la réplication virale. Enfin, on étudie la possibilité d'inhiber la kinase cellulaire recrutée par ce complexe, et responsable de l'activation des polymérases cellulaires qui assurent la transcription.

Les protéines de **nucléocapside** protègent l'ARN viral et permettent son transfert en périphérie de la cellule où les différentes composantes virales vont s'assembler pour bourgeonner. Elles stimulent en outre les processus de transcription inverse, d'intégration, d'autoclivage de la protéase et de maturation. Leur structure contient deux motifs particuliers appelés doigts de zinc. Certaines molécules ont été conçues pour libérer le zinc de ces motifs, entraînant une déstructuration et une inactivation de la nucléocapside. Parmi eux, un composé de type azodicarbonamide est en phase I/II d'essais cliniques⁷⁶.

Enfin, le processus de **maturation** peut être bloqué en inhibant l'action de la protéase. Parmi les traitements disponibles actuellement, on trouve huit antiprotéases (Tableau 1.1.). Ces composés, de nature peptidique (ou plus exactement peptidomimétique, c'est-à-dire mimant les peptides, substrats naturels de l'enzyme),

interagissent avec le site actif de la protéase, empêchant ainsi l'entrée et le clivage des précurseurs polyprotéiques gag et gag-pol. L'apparition de cette nouvelle classe de médicaments, au milieu des années 90, peut être considérée comme un réel progrès dans le traitement du SIDA (Figure 1.1), surtout lorsqu'elle est associée aux inhibiteurs de la transcriptase inverse. En effet, on agit alors à différents stades du cycle de réplication du virus, en bloquant simultanément la transcription inverse et la maturation. Le VIH est alors doublement paralysé : il ne contamine plus le génome des cellules saines, tandis que les cellules infectées produisent uniquement des virions immatures. Notons cependant que l'efficacité des antiprotéases actuelles peut être rapidement limitée par l'apparition de souches virales mutantes résistantes au traitement. Les problèmes liés à leur toxicité et à leur capacité à atteindre leur cible (on parle alors de biodisponibilité) ne sont également pas négligeables. Nous verrons, dans le chapitre suivant, que les nouvelles générations d'inhibiteurs de la protéase, pour la plupart non peptidiques, tentent de surmonter ces points d'achoppement. Outre une excellente activité, ils combinent généralement une bonne adaptation aux souches virales résistantes, une plus faible toxicité, ainsi qu'une meilleure biodisponibilité. Plusieurs composés sont actuellement soumis aux phases avancées des essais cliniques ; on espère donc disposer, d'ici peu, de nouveaux médicaments plus performants.

II. Agents antiviraux stimulant le système immunitaire⁷⁷⁻⁸⁰

Dès l'identification du VIH, la mise au point d'un vaccin a focalisé l'attention de nombreux groupes de recherche. En effet, on peut considérer que seul un vaccin pourrait enrayer l'épidémie, surtout dans les régions où elle fait rage et ne laisse aux populations que peu d'espoir, comme en Afrique. Le principe de la vaccination est simple : on inocule au patient un agent infectieux, appelé aussi immunogène, que l'on a, au préalable, rendu inoffensif. Celui-ci protège l'organisme en sensibilisant le système immunitaire, afin qu'il le reconnaisse et le détruise lorsqu'il le rencontrera ultérieurement. Cependant, sa réalisation représente un véritable défi. La difficulté tient en partie du fait que contrairement aux autres infections virales aiguës, les réactions immunitaires n'arrêtent pas l'infection par le VIH. Comment, dès lors, faire mieux que la nature ? D'autres problèmes peuvent également être mentionnés. Ainsi, les préparations vaccinales classiques, comme des virus entiers inactivés ou des virus vivants atténués, risquent d'avoir des conséquences dramatiques, car ils peuvent évoluer au cours du temps et retrouver leur caractère infectieux. De plus, on ne connaît pas d'agents immunogènes naturels du VIH qui pourraient induire une immunité large et à long terme ; on doit donc procéder par tâtonnements pour les identifier. La

recherche se tourne ainsi, à l'heure actuelle, vers la glycoprotéine d'enveloppe gp160 ou encore vers certaines protéines de régulation comme Tat ou Nef. La diversité génétique du VIH représente également un obstacle majeur : il est très difficile de mettre au point un vaccin qui serait efficace sur la multitude de souches virales existantes. Le modèle animal utilisé pour le développement d'un vaccin présente lui aussi des limites : seuls les primates permettent d'évaluer les différents prototypes de vaccins. L'infection par le VIS (Virus d'Immunodéficience Simienne) déclenche en effet chez ces singes des symptômes comparables à ceux observés chez les personnes atteintes par le VIH. Il n'est cependant pas toujours possible d'extrapoler à l'homme les résultats des tests obtenus chez le singe. Cela rend extrêmement difficile le passage aux essais cliniques sur l'homme. Face à ces difficultés, de nombreuses stratégies de conception de vaccins ont été imaginées. Ainsi, depuis le début de la recherche anti-VIH, plus de 70 vaccins différents ont été soumis à des tests cliniques de phase I ; seuls, deux d'entre eux ont été autorisés à passer en phase III mais ils se sont finalement soldés par un échec. On peut constater que malgré la quantité et l'inventivité du travail effectué à ce jour, la recherche d'un vaccin anti-VIH est toujours d'actualité⁸¹.

Les approches chimiothérapeutiques ont permis une prise en charge plus efficace de la personne séropositive. En outre, la perspective d'un vaccin est porteuse de nombreux espoirs dans la lutte contre l'épidémie du SIDA. Aujourd'hui, les malades qui ont accès aux traitements disposent de thérapies individualisées⁸², reposant sur des combinaisons optimales de différents types d'agents anti-viraux et appelées HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapies)^{83,84}. En pratique, on associe au moins trois médicaments appartenant aux classes des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ou des inhibiteurs de la protéase (IPR), typiquement deux INTI et un INNTI ou un IPR. Ces traitements sont très efficaces. Ils diminuent le taux de virus en-dessous du seuil de détection et permettent au système immunitaire de retrouver un fonctionnement normal. Les symptômes associés au SIDA disparaissent, ce qui améliore considérablement la qualité et l'espérance de vie du patient.

Cependant, les médecins doivent rapidement faire face à de nombreux problèmes^{85,86} dont le plus préoccupant est sans doute le phénomène de résistance virale aux médicaments⁸⁷⁻⁹⁰. En effet, nous avons vu que la réplication virale nécessite la transcription inverse de l'ARN viral en ADN. La transcriptase inverse, qui assure le déroulement de cette étape clé, n'a pas les moyens de corriger les erreurs de

transcription. Il en résulte un taux de mutations très élevé. Par le mécanisme de sélection naturelle, les souches virales mutantes les mieux adaptées à leur environnement, c'est-à-dire insensibles aux différents médicaments, vont être favorisées et vont se multiplier. Au bout d'un certain temps, le traitement devient inefficace. Il faut alors choisir une autre combinaison d'antiviraux en prenant soin de sélectionner les inhibiteurs qui agissent encore sur les souches mutantes présentes dans l'organisme. La résistance virale apparaît d'autant plus vite que le traitement est interrompu : le virus jusque là sous contrôle profite de la faille pour se répliquer et produire des mutants plus virulents. Or, l'adhérence aux différentes thérapies est problématique pour la plupart des personnes séropositives⁹¹. Elles sont très contraignantes : les médicaments doivent être pris à horaire fixe, aucune prise ne peut être oubliée ; ils entraînent des effets secondaires à court terme parfois spectaculaires, donc 'dénonciateurs', ou très inconfortables tandis qu'à long terme de graves désordres métaboliques peuvent apparaître^{92,93} ; enfin, la quantité de pilules à absorber quotidiennement est impressionnante : on doit traiter non seulement l'infection par le VIH, mais aussi les maladies opportunistes et les nombreux effets secondaires. En bout de course, il arrive que les souches virales présentes dans l'organisme du patient soient réfractaires à tout traitement. Pour cette catégorie de malade, la mise sur le marché de nouvelles molécules antivirales, bloquant la réplication des souches mutantes, est absolument vitale.

D'autres défis restent à relever. Ainsi, une guérison ne peut être envisagée qu'à partir du moment où tous les virus présents dans l'organisme sont anéantis. Or, il existe certaines cellules contaminées par le virus, comme les macrophages ou les lymphocytes T4 'mémoire' au repos possédant une très longue durée de vie, qui échappent au système immunitaire et aux agents antiviraux actuels^{94,95}. On retrouve ces réservoirs, par exemple, dans le cerveau, ou dans le système lymphatique. Enfin, il est évident que tous les malades souffrant du SIDA n'ont pas un accès égal aux soins. Si le coût, par ailleurs fort élevé (environ 15000 euros par personne et par an⁸⁵), des multithérapies est bien pris en charge par la sécurité sociale de nos pays industrialisés, ce n'est malheureusement pas le cas dans le reste du monde. Malgré les déclarations remplies de bonnes intentions proclamant la nécessité de distribuer gratuitement les médicaments anti-VIH, seuls 7 % des personnes séropositives dans le monde ont accès à un traitement, et il est fort probable que la grande majorité des gens touchés par l'épidémie resteront encore longtemps abandonnés à leur triste sort¹⁰.

Pour conclure ce chapitre, je citerai le Professeur Rozenbaum³, que l'on considère comme un pionnier dans la lutte contre le SIDA en France : *"Indiscutablement, concernant le vaccin et la guérison, nous sommes aujourd'hui impuissants. Ce n'est nullement une raison pour nous y résigner. Nous devons au contraire mobiliser les énergies et les intelligences. "Y croire" et continuer ne signifie pas céder à l'illusion de la toute puissance, mais faire confiance à l'étonnante énergie créatrice des hommes. "*

2. La protéase du virus de l'immunodéficience humaine

2.1. *La protéase du VIH-1, un enzyme particulièrement bien décrit*

...Appartenant à la famille des protéinases à acides aspartiques

Les enzymes protéolytiques, appelés peptidases ou protéases, sont impliqués dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques ; on peut dès lors les compter parmi les protéines les plus étudiées en biochimie⁹⁶. Ils catalysent le clivage de certaines liaisons peptidiques au sein d'une séquence d'acides aminés. Les protéases regroupent deux familles enzymatiques : les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques se trouvant aux extrémités C ou N terminales de certaines protéines, tandis que les endopeptidases, appelées également protéinases, visent plutôt les liaisons peptidiques localisées à l'intérieur de la séquence d'acides aminés ciblée⁹⁷. Par ailleurs, deux types d'action peuvent être relevés: on parle de protéolyse limitée lorsqu'un nombre déterminé de liaisons peptidiques est clivé, ce qui entraîne l'activation ou la maturation de certaines protéines jusque là inactives ; par contre, la protéolyse illimitée permet la dégradation des protéines en ses acides aminés constitutifs.

Les endopeptidases sont habituellement classées en quatre sous-groupes suivant leur mécanisme catalytique^{97,98}.

- **les protéinases à sérine** comprennent deux familles distinctes. On trouve des protéinases à sérine de type I chez les mammifères, par exemple, la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et la thrombine, ou de type II chez les bactéries comme la subtilisine. Elles peuvent être associées à certaines pathologies, notamment la poliomyélite ou le cancer.

- **les protéinases à cystéine** incluent, chez les mammifères, plusieurs types de cathepsines localisées dans les lysosomes et servant à la dégradation des protéines. On pense que certaines cathepsines sont impliquées dans les maladies telles que l'arthrite ou la propagation des tumeurs cancéreuses. Chez les plantes, le représentant le plus connu de cette classe d'enzyme est la papaïne. On trouve également des protéinases à cystéine chez les organismes parasites responsables notamment de la malaria ou de la maladie du sommeil. Elles y assurent des fonctions essentielles à la survie du parasite comme le clivage des protéines de l'hôte.

- **les métalloprotéinases** impliquent typiquement un atome métallique, généralement du zinc, dans leur mécanisme catalytique. Chez les mammifères, les collagénases assurent la dégradation de certaines protéines et peuvent être impliquées dans les mécanismes de propagation du cancer. Dans cette classe, on retrouve d'autres enzymes bien connus comme par exemple l'enzyme de conversion (ACE) qui joue un rôle clé dans le système rénine-angiotensine en permettant la libération de l'angiotensine II, un agent vasoconstricteur puissant, impliqué dans les pathologies liées à l'hypertension, ou encore la thermolysine chez les bactéries.

- **les protéinases à acides aspartiques** appartiennent pour la plupart à la famille des pepsines qui incluent notamment des enzymes digestifs comme la pepsine gastrique ou la chymosine. D'autres exemples de protéinases à acides aspartiques peuvent être mentionnés : la cathepsine D que l'on retrouve dans les lysosomes et la rénine qui assure le clivage de l'angiotensinogène, précurseur de l'angiotensine II. Enfin, on peut classer dans cette quatrième catégorie une série de protéinases virales.

La protéase du VIH-1, appelée également rétropepsine, appartient à cette dernière classe. En effet, on retrouve au sein de la séquence primaire d'acides aminés la triade catalytique Aspartate 25 - Thréonine 26 - Glycine 27 (Asp-Thr-Gly) caractérisant les protéinases à acides aspartiques⁹⁹ (Tableau 2.1). Des études de mutagenèse ont pointé l'importance de cet aspartate 25 en montrant que sa mutation en thréonine ou en asparagine conduit à la production d'une protéase mutante incapable d'assurer la maturation du virus¹⁰⁰⁻¹⁰². Comme la plupart des pepsines, la protéase du VIH-1 est, en outre, inactivée *in vitro* par la pepstatine¹⁰¹, et par l'époxyde

Tableau 2.1. Séquence primaire de la protéase du VIH-1. La triade catalytique est reprise en gras.

Pro	Gln	Ile	Thr	Leu	Trp	Gln	Arg	Pro	Leu	10
Val	Thr	Ile	Lys	Ile	Gly	Gly	Gln	Leu	Lys	20
Glu	Ala	Leu	Leu	Asp	Thr	Gly	Ala	Asp	Asp	30
Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Leu	Pro	Gly	40
Arg	Trp	Lys	Pro	Lys	Met	Ile	Gly	Gly	Ile	50
Gly	Gly	Phe	Ile	Lys	Val	Arg	Gln	Tyr	Asp	60
Gln	Ile	Leu	Ile	Glu	Ile	Cys	Gly	His	Ile	70
Ala	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	80
Pro	Val	Asn	Ile	Ile	Gly	Arg	Asn	Leu	Leu	90
Thr	Gln	Ile	Gly	Cys	Thr	Leu	Asn	Phe		99

EPNP (3-(4-nitro)-phénoxy-1,2-époxypropane)¹⁰³.

Lorsque l'on compare la protéase du VIH-1 avec d'autres protéinases à acides aspartiques cellulaires, on peut cependant pointer certaines différences structurales. Ainsi, la protéase du VIH-1 n'est active que sous forme dimérique, chaque monomère comprenant 99 acides aminés. Les protéases cellulaires sont, par contre, monomériques et relativement plus grandes que leurs cousines virales, puisqu'elles comptent plus de 300 acides aminés. Les protéases monomériques présentent une forme bilobée, constituée majoritairement de feuillets β se repliant pour former deux zones structurellement similaires. A la jonction des deux domaines, se trouve le site catalytique comprenant les deux acides aspartiques essentiels à l'activité enzymatique. On observe également au niveau de la partie N-terminale de ces enzymes cellulaires un feuillet β en épingle à cheveux. Il correspond à une sorte de volet flexible (dont la dénomination anglaise est flap) qui permet l'entrée et la fixation du substrat ou de l'inhibiteur dans le site actif¹⁰⁴.

La protéase du VIH-1 est également composée essentiellement de feuillets β (une seule hélice α par monomère) mais ne possède quant à elle qu'un acide aspartique catalytique sur chacun des monomères. Une activité enzymatique n'est donc possible que lorsque deux sous-unités sont réunies de manière à former un homodimère symétrique (symétrie C2) à l'interface duquel se trouvent les deux aspartates catalytiques (Figure 2.2.). Lorsqu'un substrat se lie à une protéase dimérique, il y adopte une conformation étendue, ce qui est également la règle pour les protéases monomériques. Ici aussi, l'entrée et la fixation du substrat sont accompagnées par un mouvement très ample de deux volets flexibles appartenant chacun à un monomère¹⁰⁵. De nombreuses interactions peuvent alors être relevées entre les flaps, le substrat et la partie rigide du site actif. Plus particulièrement, notons qu'une interaction importante entre substrat et flaps se forme par l'intermédiaire d'une molécule d'eau structurale, enfouie au sein du complexe enzyme/ligand. Ce mode de liaison est caractéristique des protéases rétrovirales¹⁰⁶.

La figure 2.1. nous permet de visualiser les ressemblances entre la structure cristallographique d'une protéase monomérique, la rhizopuspepsine¹⁰⁷, et deux conformations, l'une cristallographique et l'autre théorique, de la protéase du VIH-1¹⁰⁸, toutes trois en l'absence de substrat. Les similarités troublantes observées appuient l'hypothèse selon laquelle les protéases monomériques se seraient formées au cours de l'évolution par duplication d'un gène et fusion d'une protéinase à acides aspartiques dimérique ancestrale^{104,109}. Cette perte de symétrie permet alors à chaque domaine de la protéase cellulaire de se spécialiser afin d'assurer une activité

enzymatique optimale. Les protéases rétrovirales, par contre, ont conservé leur forme dimérique, ce qui permet au virus d'économiser son matériel génétique et de gagner en mobilité¹¹⁰.

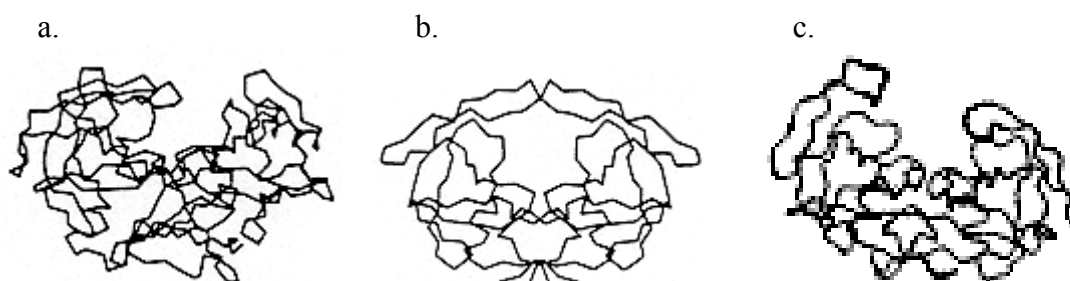


Figure 2.1. Comparaison entre les structures de protéases monomériques et dimériques. Structures cristallographiques¹⁰⁷ de a. la rhizopuspepsine et b. la protéase du VIH-1. c. Conformation théorique de la protéase du VIH-1 obtenue à l'issue d'une simulation par dynamique moléculaire des mouvements de la protéine en solution¹⁰⁸.

Nous verrons dans le point 2.2. que lors de la conception d'inhibiteurs, il est important d'exploiter ces similarités et ces différences structurales. En effet, l'objectif premier est de bloquer l'activité de la protéine virale sans pour autant interférer sur le fonctionnement des protéines cellulaires indispensables à notre organisme. Afin d'obtenir une telle sélectivité lors de l'inhibition de la protéase du VIH-1, différentes stratégies se sont basées sur la nature dimérique de l'enzyme et sur sa symétrie. Par ailleurs, les interactions uniques formées entre le substrat ou l'inhibiteur et les volets flexibles de l'enzyme ont été largement exploitées. Ainsi, la prise en compte de la molécule d'eau servant de relais entre le substrat et les deux flaps s'est révélée être une étape cruciale dans la mise au point d'inhibiteurs puissants et sélectifs.

...possédant une structure tridimensionnelle largement caractérisée

En 1989, trois laboratoires de recherches publiaient, indépendamment les uns des autres, les premières structures cristallographiques de la protéase du VIH-1¹¹¹⁻¹¹³. Quelque 15 années plus tard, la famille des protéases rétrovirales est devenue la classe de protéine la plus étudiée par les techniques de cristallographie. Plus de 250 structures tridimensionnelles de la protéase du VIH-1, complexée ou non à un inhibiteur et issues d'étude de cristallographie ou de RMN sont accessibles sur le net dans des banques de données spécialisées, comme PDB (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org>) ou

HIVdb (<http://mc11.ncifcrf.gov/hivdb/>). Ce nombre déjà impressionnant en soi ne représente vraisemblablement qu'une petite partie des structures cristallographiques déterminées dans les différents laboratoires de recherches dédiés à la lutte contre le VIH¹⁰⁶. Ces banques de données contiennent une mine d'informations sur la structure tridimensionnelle de la protéase ainsi que sur les interactions formées entre l'enzyme et ses inhibiteurs ou substrats.

La protéase du VIH-1 est une petite protéine enzymatique hydrophobe se présentant sous la forme d'un homodimère d'une masse moléculaire de 22 kD. Celui-ci est constitué de deux monomères identiques contenant chacun 99 acides aminés et dont la séquence primaire est reprise à la figure 2.1. Si la structure tridimensionnelle du monomère de la protéase a récemment été résolue¹¹⁴, des études de calorimétrie ont montré que la stabilité générale de l'enzyme est due essentiellement à sa dimérisation¹¹⁵. Certaines régions de l'enzyme contribuant à la cohésion du dimère peuvent être pointées. Ainsi les extrémités C et N terminales (résidus 1-5 et 95-99) sont étroitement imbriquées en un feuillet β assurant à lui seul 75% de la stabilité dimérique¹¹⁵. Des études de mutagenèse ont par ailleurs mis en évidence que les résidus 95-99 sont absolument essentiels à la formation du dimère puisque leur délétion entraîne la dissociation des deux sous-unités et la perte de toute activité enzymatique¹¹⁶. La base du site actif ainsi que l'extrémité des flaps correspondant respectivement aux résidus 26, 27 et 29 et 49, 50 et 51 participent également à la cohésion du dimère¹¹⁵ de même que la séquence Gly86-Arg87-Asn88 localisée au sein de l'hélice α et propre aux protéases rétrovirales¹¹⁷. En effet, des études de Résonance Magnétique Nucléaire¹¹⁶ et de dynamique moléculaire¹¹⁸ ont montré que la mutation de l'arginine 87 en lysine ou de l'asparagine 88 en glutamine entraînait la déstructuration du réseau de ponts hydrogène existant entre monomères et conduisait dès lors à la dissociation du dimère et à la perte d'activité enzymatique. Enfin, la présence d'un inhibiteur ou d'un substrat au sein du site actif de l'enzyme renforce la cohésion du dimère¹¹⁶.

L'analyse systématique de la contribution de chaque résidu à la stabilité générale de l'enzyme peut être intéressante pour concevoir des inhibiteurs qui échapperont au phénomène de résistance virale. En effet, les résidus contribuant à la stabilité de la protéase auront moins tendance à muter sous la pression sélective du médicament. Ils peuvent donc être plus particulièrement ciblés lors de la mise au point d'inhibiteurs^{90,115}.

Outre le cœur hydrophobe de l'enzyme comprenant l'interface de dimérisation, on peut pointer deux autres régions structurales importantes au sein de la protéase : le site actif et les volets mobiles appelés flaps (Figure 2.2.).

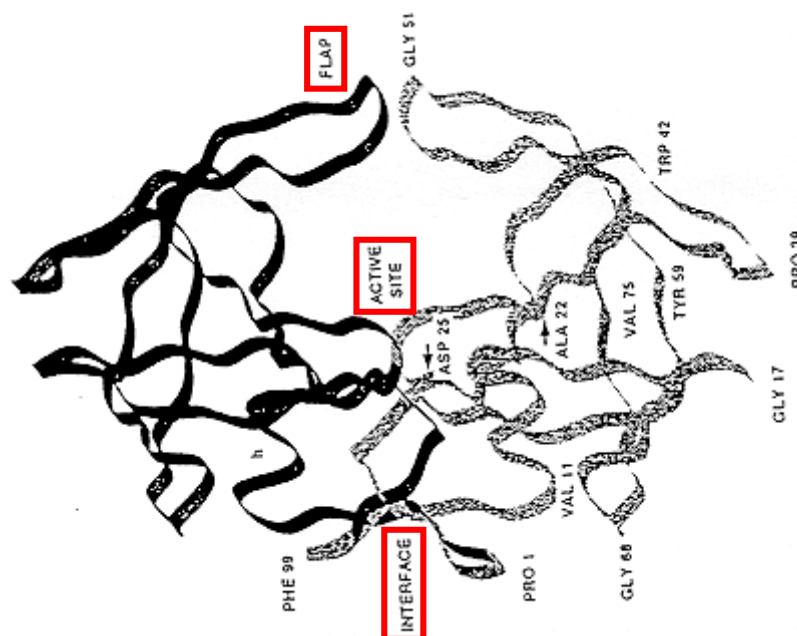


Figure 2.2. Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 (code PDB : 3hvp¹¹¹).

Le site actif se présente globalement sous la forme d'un cylindre d'environ 20 Å de long sur 10 Å de diamètre s'étendant de part et d'autre du site catalytique. Il est délimité par une région rigide et stable comprenant les deux triades catalytiques (résidus 25-30, 81, 82, 84) et par une région mobile stabilisée après la liaison du substrat ou de l'inhibiteur et correspondant à la face interne des flaps (résidus 46-50)¹¹⁵. Il peut être subdivisé en sous-sites accueillant chacun un résidu du substrat. La nomenclature de Schechter et Berger¹¹⁹ (Figure 2.3.) assigne la dénomination P et S respectivement aux résidus du substrat du côté aminoterminal et aux sous-sites correspondants, tandis que du côté carboxyterminal, ils deviennent P' et S'. Les deux acides aminés qui sont immédiatement adjacents à la liaison hydrolysable sont appelés P1 et P1', les deux suivants P2 et P2', etc ... Ils se logent respectivement dans les sous-sites S1 et S1', S2 et S2'...

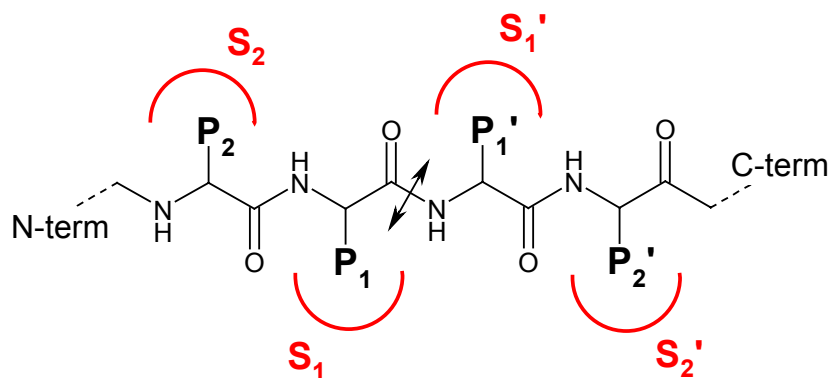


Figure 2.3. Nomenclature de Shechter et Berger. Le substrat est représenté en noir, les sous-sites de la protéase en rouge. Le lien hydrolysable est, quant à lui, symbolisé par une double flèche. La triade catalytique est localisée perpendiculairement au plan formé par le substrat, au niveau du lien hydrolysable.

Les sous-sites S1/S1' à S3/S3' forment en général des poches aux contours bien délimités par un certain nombre d'acides aminés (Tableau 2.2.).

Tableau 2.2. : Principaux résidus du site actif de la protéase du VIH-1 définissant les sous-sites S1/S1', S2/S2' et S3/S3'¹²⁰.

S1/S1'	S2/S2'	S3/S3'
Leu123/23, Asp125/25, Gly27/127, Gly49/149, Ile50/150, Pro181/81, Val182/82, Ile184/84	Ala28/128, Asp29/129, Asp30/130, Val32/132, Ile47/147, Gly48/148, Ile150/50, Leu76/176, Ile84/184	Arg108/8, Asp29/129, Gly48/148, Gly49/149, Pro181/81, Val182/82

Ainsi, pour la protéase du VIH-1, on distingue les sous-sites S1/S1' relativement spacieux et constitués de résidus hydrophobes à l'exception des aspartates 25/125 catalytiques. Ils accueillent en leur sein des résidus principalement hydrophobes. Les sous-sites S2/S2' sont plus petits. Ils contiennent un certain nombre d'acides aminés hydrophobes mais aussi quelques résidus hydrophiles qui peuvent interagir par pont hydrogène avec un substrat ou un inhibiteur. Les sous-sites S3/S3', quant à eux, sont plus étendus et présentent une ouverture vers le solvant. Moins spécifiques, ils accommodent une grande variété de résidus aussi bien hydrophobes qu'hydrophiles¹⁰⁶ (Figure 2.4.).

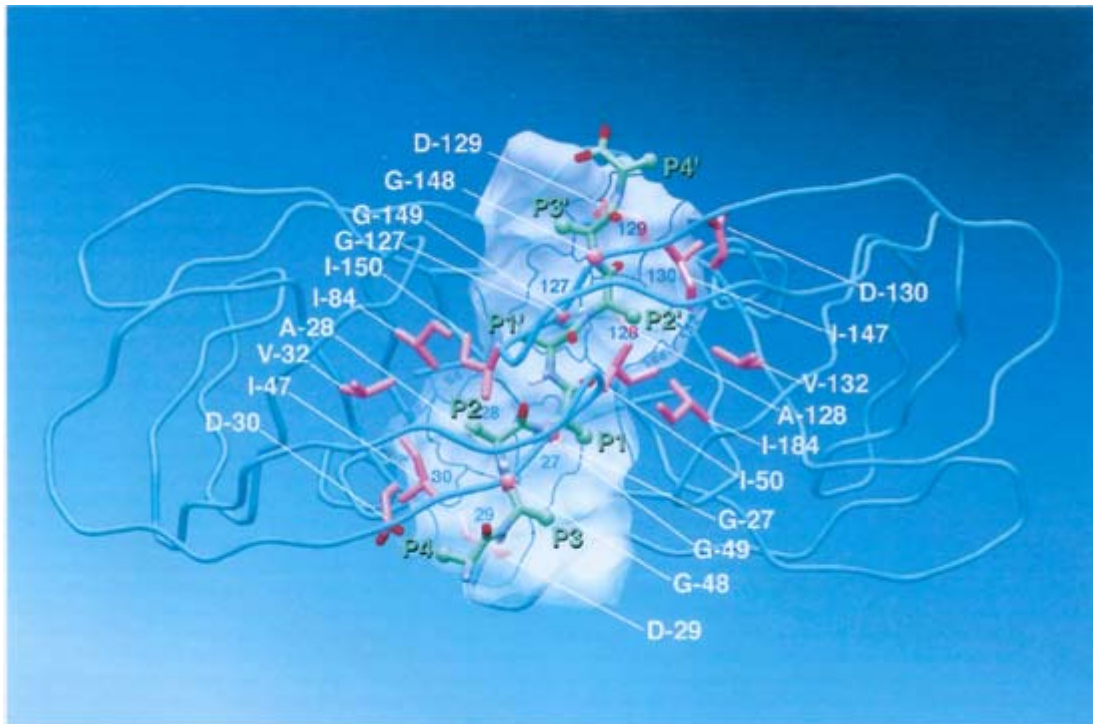


Figure 2.4. Interaction d'une chaîne peptidique avec le site actif de la protéase. Les chaînes latérales des principaux acides aminés délimitant les différents sous-sites sont reprises en rouge¹⁰⁶.

Dans les protéases rétrovirales, les sous-sites S1/S1', S2/S2', ... sont symétriques. On utilise d'ailleurs cette caractéristique dans certaines stratégies de conception de médicaments. Par contre, il est intéressant de noter que les substrats devant être hydrolysés ne présentent pas cette symétrie, ni au niveau de la taille des résidus homologues, ni par leurs propriétés électrostatiques. Le tableau 2.3 reprend les différents sites de clivage recensés au sein des polyprotéines gag et gag-pol¹²⁰.

La variété des substrats clivés par la protéase du VIH-1 rend difficile l'élaboration d'une séquence d'acides aminés consensus. D'autres mécanismes entrent donc en compte pour expliquer la spécificité de l'enzyme. L'analyse de la structure cristallographique de six substrats (repris en gras dans le tableau 2.3.) complexés à la protéase (mutant inactif Asp25Asn) a montré que le processus de reconnaissance spécifique enzyme-substrat est plutôt guidé par le volume global occupé par le peptide au sein du site actif. Ce volume présente curieusement une asymétrie assez importante, les résidus P3, P1, P2' étant généralement de plus petite taille que leurs homologues orientés vers l'autre monomère de la protéase¹²⁰. La liaison d'un substrat à la protéase implique donc une rupture de symétrie au sein de l'enzyme via une réorganisation de sa structure tridimensionnelle¹²¹. Pour pouvoir se fixer au sein du site actif de la protéase afin d'y être hydrolysés, les substrats présentent en outre certaines caractéristiques plus classiques. Ils doivent compter au moins 7 à 8 résidus pouvant adopter une conformation étendue. C'est, en effet, dans cette conformation que de

nombreux ponts hydrogène et d'interactions non polaires pourront se former, permettant aux chaînes latérales des acides aminés du substrat de s'adapter aux sous-sites de l'enzyme afin d'orienter de façon optimale le lien peptidique à cliver.

Tableau 2.3. Séquences peptidiques localisées au sein des polyprotéines gag et pol et clivées spécifiquement par la protéase. Les substrats repris en gras ont été cocrystallisés avec l'enzyme. La liaison peptidique hydrolysable est représentée par une astérisque.

Sites de clivage		P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	
gag	MA-CA	Val	Ser	Gln	Asn	Tyr	*	Pro	Ile	Val	Gln	Asn
	CA-p2	Lys	Ala	Arg	Val	Leu	*	Ala	Glu	Ala	Met	Ser
	p2-NC	Pro	Ala	Thr	Ile	Met	*	Met	Gln	Arg	Gly	Asn
	NC-p1	Glu	Arg	Gln	Ala	Asn	*	Phe	Leu	Gly	Lys	Ile
	p1-p6	Arg	Pro	Gly	Asn	Phe	*	Leu	Gln	Ser	Arg	Pro
pol	TF-PR	Val	Ser	Phe	Asn	Phe	*	Pro	Gln	Ile	Thr	Leu
	AutoP	Pro	Gln	Ile	Thr	Leu	*	Trp	Lys	Arg	Pro	Leu
	PR-RT	Cys	Thr	Leu	Asn	Phe	*	Pro	Ile	Ser	Pro	Ile
	RT-RH	Gly	Ala	Glu	Thr	Phe	*	Tyr	Val	Asp	Gly	Ala
	RH-IN	Ile	Arg	Lys	Ile	Leu	*	Phe	Leu	Asp	Gly	Ile

Lors de la fixation du substrat dans le site actif de la protéase, on observe, de plus, un changement de conformation majeur de l'enzyme. En effet, les résidus 33-62/133-162 forment des feuillets β en épingle à cheveux, les volets ou flaps, qui constituent la partie la plus flexible de l'enzyme, comme l'ont montré des études de RMN ^{122,123}, de spectrofluorométrie ^{124,125} et de dynamique moléculaire ^{108,126,127}. Pour permettre l'entrée d'un substrat dans le site actif, les flaps doivent être suffisamment ouverts. Ils se replient ensuite vers l'intérieur du site actif, bloquant le peptide dans une orientation permettant un clivage optimal du lien peptidique et réduisant par la même occasion l'accessibilité au solvant. La réouverture des flaps est enfin nécessaire à la libération des produits de protéolyse.

On dispose à l'heure actuelle de plusieurs centaines de structures cristallographiques de la protéase du VIH-1, complexée ou non à un inhibiteur ou à un substrat. En présence d'un ligand, on observe bien, dans la grande majorité des cas, un repliement des flaps sur ce dernier (Figure 2.5.a.). Lorsque l'enzyme est cristallisé seul, les flaps adoptent une conformation semi-ouverte (Figure 2.5.b.). Pour passer d'une conformation cristallographique à l'autre, un mouvement atteignant 7 Å au sommet des flaps est observé mais il ne suffit cependant pas à créer une ouverture assez grande pour laisser passer un ligand.

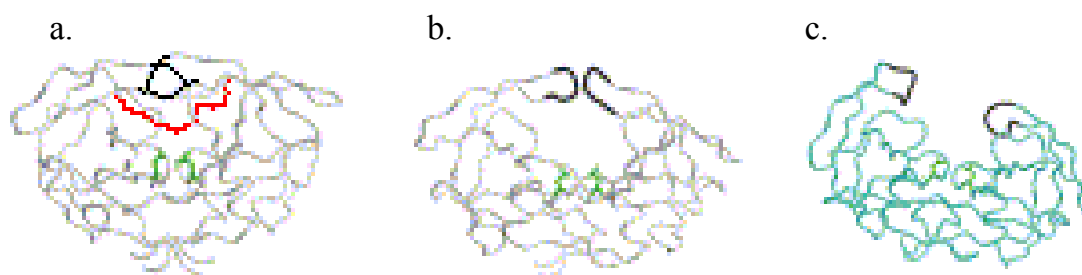


Figure 2.5. Flexibilité de la protéase du VIH-1. Les mouvements les plus importants sont localisés au niveau des flaps dont les extrémités (résidus 48-52) sont reprises en noir. Structure cristallographique de la protéase complexée à un substrat (coloré en rouge)¹²¹. b. Structure cristallographique de la protéase seule¹²⁸. c. Simulation de l'ouverture des flaps par dynamique moléculaire¹⁰⁸.

Des études de dynamique moléculaire, corrélées avec des données de mutagenèse et de RMN, ont permis de simuler le processus d'ouverture des flaps¹⁰⁸. Une hypothèse intéressante en découle : le sommet flexible des flaps comprenant la séquence Gly48-Gly49-Ile50-Gly51-Gly52 se recourberait sur les résidus du site actif Val32, Pro79-Thr80-Pro81, laissant ainsi le passage libre au substrat (Figure 2.5.c.). Cette avancée dans la description de la flexibilité de l'enzyme ouvre de nouvelles perspectives dans la mise au point d'anti-protéases visant plus spécialement les flaps.

Enfin, il reste à mentionner que dans la plupart des structures cristallographiques de la protéase complexée à un ligand, une interaction particulière par ponts hydrogène se forme entre les résidus Ile50/150 localisés au sommet des flaps et le

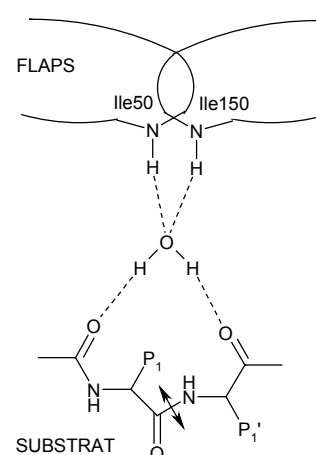


Figure 2.6. Représentation schématique de l'interaction se produisant entre les résidus 50/150 et le substrat *via* une molécule d'eau caractéristique.

substrat ou l'inhibiteur par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Elle se trouve dans l'axe formé par les isoleucines 50/150, le lien hydrolysable et les aspartates 25/125 catalytiques (Figure 2.6.). Cette molécule d'eau extrêmement bien conservée est caractéristique des protéases rétrovirales. Elle servirait à fixer le substrat dans une orientation adéquate au processus d'hydrolyse et permettrait plus particulièrement d'abaisser l'énergie d'activation existant entre l'intermédiaire réactionnel tétraédrique et la libération des produits de l'hydrolyse¹²⁹. Nous détaillerons ce mécanisme dans le paragraphe suivant.

...fonctionnant selon un mécanisme de catalyse acide-base typique

Les protéases à acides aspartiques hydrolysent leurs substrats suivant un mécanisme de catalyse acide-base général¹³⁰ où les acides aspartiques 25/125 vont activer une molécule d'eau qui servira de nucléophile lors de l'attaque du lien peptidique à hydrolyser (Figure 2.7.). Dans le site actif non complexé, cette molécule d'eau catalytique interagit par ponts hydrogène avec les deux acides aspartiques 25/125 dont l'un est protoné et l'autre pas. Lors de la liaison du substrat, l'aspartate déprotoné capte un proton de la molécule d'eau, qui effectue alors l'attaque nucléophile du groupement carbonyle de la liaison peptidique scissile, pour générer un intermédiaire tétraédrique stabilisé par le second résidu aspartique. La protonation de l'amine correspondante initie alors la rupture de l'intermédiaire, libérant ainsi les produits de protéolyse.

De nombreuses études expérimentales et théoriques ont été effectuées pour valider l'application de ce modèle à la protéase du VIH-1. Ainsi, on peut relever des calculs *ab initio* effectués sur des fragments modèles¹³¹⁻¹³³, des études de dynamique moléculaire¹³⁴⁻¹³⁸ et de mécanique moléculaire combinée à la mécanique quantique (QM/MM)^{135,139} effectuées sur l'enzyme complexé ou pas à un substrat. D'un point de vue expérimental, des modèles ont notamment été établis sur base de résultats cristallographiques^{140,141}, d'études cinétiques¹⁴² et de résonance magnétique nucléaire (RMN)¹⁴³⁻¹⁴⁵. Si ces études ont permis de montrer que la protéase du VIH-1 fonctionne bien selon le schéma général des protéases à acides aspartiques, des zones d'ombre subsistent notamment quant aux détails mécanistiques encourus lors de l'hydrolyse, quant à l'état de protonation des acides aspartiques qui semble dépendre du type de ligand présent dans le site actif, et quant à la position de la molécule d'eau dans le site de clivage^{136,146}.

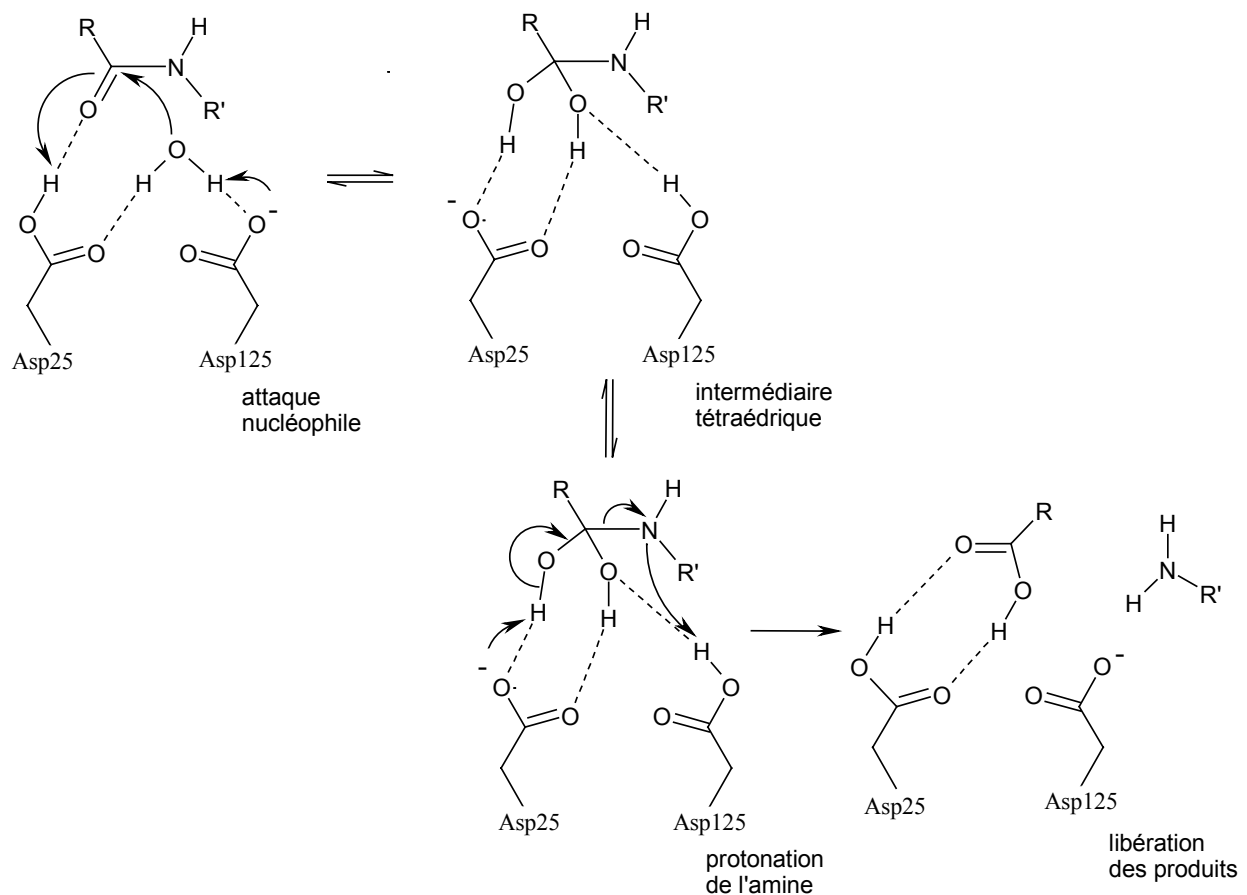


Figure 2.7. Mécanisme d'hydrolyse acide-base d'un substrat par une protéase à acide aspartique.

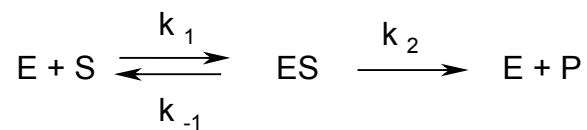
Certains mécanismes permettent à la protéase du VIH-1 de fonctionner d'une manière optimale. En effet, son activité doit être régulée pour éviter un clivage des précurseurs polyprotéiques trop rapide qui empêcherait le bourgeonnement et la formation de nouvelles particules virales infectieuses¹⁴⁷, ou trop efficace qui provoquerait une dégradation non spécifique des protéines virales¹⁴⁸. L'action de la protéase est initiée lorsque les polyprotéines gag-pol sont en concentration suffisante à la surface de la cellule hôte pour permettre leur dimérisation et donc la dimérisation du domaine correspondant à la protéase. Le processus de reploiement de la chaîne peptidique de la protéase – ou folding, en anglais- est d'ailleurs initié à partir du domaine de dimérisation de l'enzyme, menant ainsi à son activation¹⁴⁹. Les proportions en polyprotéines gag-pol sont faibles par rapport aux polyprotéines gag (environ 5%), ce qui empêche une dimérisation et une activation prématurée de la protéase¹⁵⁰. Le précurseur dimérique de la protéase est alors suffisamment actif pour s'autolibérer du côté N-terminal, au niveau du site de clivage localisé entre la nucléocapside et la protéine p6 (Figure 1.5). La libération consécutive de la protéine

p6 augmente l'activité catalytique de la protéase. Un clivage intermoléculaire peut alors se produire ensuite du côté C-terminal séparant la protéase de la transcriptase inverse et de l'intégrase^{148,150-152}. Il apparaît clairement que la protéine p6 est impliquée dans la régulation de ces mécanismes. On pense qu'elle inhibe la protéase en empêchant l'accès aux substrats ou en déstabilisant sa structure dimérique, retardant et/ou limitant ainsi l'activité protéolytique de l'enzyme^{66,148,153}.

2.2. Les stratégies de conception d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1, un panel varié représentatif du 'drug design' actuel

...s'appuyant sur les principes de cinétique enzymatique¹⁵⁴

Une réaction enzymatique au cours de laquelle un substrat S est transformé en produit P par l'enzyme E peut être représenté comme suit :



où ES représente le complexe de Michaelis et Menten.

A l'état stationnaire où, seules, les concentrations des substrats et des produits changent, la constante K_m , caractéristique d'un enzyme et d'un substrat donnés, est définie par :

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

k_1/k_{-1} correspond à la constante de dissociation du complexe de Michaelis et Menten en E et S. Cette constante notée K_d , exprime l'inverse de l'activité de l'enzyme pour son substrat : plus K_d est faible et plus l'affinité est importante. Dès lors, la relation précédente devient :

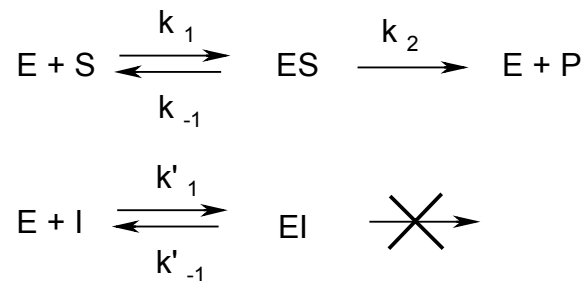
$$K_m = K_d + \frac{k_2}{k_1}$$

Lorsque k_2 est très petit par rapport à k_1 , on peut confondre K_m et K_d .

Deux grands types d'inhibition susceptibles d'enrayer le processus décrit précédemment peuvent être distingués, l'un réversible, l'autre irréversible. L'inhibition réversible est caractérisée par la formation de liaisons faibles entre l'enzyme et l'inhibiteur. On retrouve, dès lors, l'activité enzymatique après élimination de l'inhibiteur. En revanche, il n'est pas possible de la récupérer après l'action d'un inhibiteur irréversible. En effet, l'inhibiteur reste, dans ce cas, lié à l'enzyme par une liaison covalente.

On peut, en outre, rencontrer différents mécanismes d'inhibition : l'inhibition compétitive, non compétitive ou incompétitive. Un inhibiteur incompétitif ne peut se fixer sur l'enzyme libre. Son affinité pour le complexe enzyme-substrat engendre la formation d'un complexe ternaire inactif. Un inhibiteur non compétitif se lie indifféremment à l'enzyme libre, ou au complexe enzyme-substrat.

Lors de l'inhibition compétitive, l'inhibiteur I entre en compétition avec le substrat S pour l'occupation du site catalytique et forme ainsi un complexe enzyme-inhibiteur EI analogue au complexe enzyme-substrat, mais non productif.



La constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur K_i est définie par le rapport k'_1 / k'_{-1} . Elle est également appelée constante d'inhibition et reflète l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Son efficacité est en outre souvent caractérisée par la valeur IC_{50} qui représente la concentration en inhibiteur nécessaire à diminuer de moitié l'activité enzymatique. Cette dernière est liée au K_i par la relation de Cheng et Prussoff :

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]_0}{K_m} \right)$$

Lorsque la concentration initiale en substrat $[S]_0$ est beaucoup plus faible que la constante K_m , on peut assimiler la valeur de IC_{50} à la constante d'inhibition K_i . En

pratique, le K_i est donc obtenu par répétition de la cinétique à diverses concentrations initiales en substrat.

Nous verrons dans les paragraphes suivants que les antiprotéases actuellement disponibles sur le marché ont été conçues sur base d'un mode d'action compétitif. Ces inhibiteurs réversibles extrêmement puissants ont des constantes d'inhibition très faibles, pour la plupart inférieures au nanomolaire. Mais d'autres approches ont également été exploitées : nous développerons plus particulièrement la mise au point d'inhibiteurs non compétitifs visant l'interface de dimérisation, la protéase n'étant active que sous forme dimérique.

...dirigées contre le site actif

Dès 1986, la protéase du VIH-1 est identifiée comme cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre le SIDA¹⁵⁵. Son appartenance à la classe des protéinases à acides aspartiques¹⁰¹ conduisit les chercheurs à s'inspirer de projets antérieurs ciblant d'autres protéases à acides aspartiques connues, telles que la rénine. Ces projets avaient utilisé efficacement le concept 'd'isostère mimant l'état de transition' dans l'élaboration d'inhibiteurs peptidomimétiques de la rénine. En effet, le postulat de Pauling¹⁵⁶ affirme qu'un enzyme présente une affinité plus grande pour l'état de transition que pour le substrat ou les produits de la réaction enzymatique. Dès lors, des molécules pseudo-peptidiques (ou peptidomimétiques) dans lesquelles les résidus P1/P1' sont remplacés par des isostères non clivables de l'état de transition sont potentiellement des inhibiteurs puissants. Parmi les différents substrats viraux de la protéase, certains peptides comprennent le site de clivage Phe/Tyr*Pro (Tableau 2.3.) spécifique des protéases rétrovirales. Ils ont donc été naturellement choisis comme modèles dans la conception des premiers inhibiteurs peptidomimétiques.

A partir de 1989, la publication de la structure cristallographique tridimensionnelle de la protéase complexée ou non aux premiers inhibiteurs peptidomimétiques^{111-113,157-161} ouvrait la voie à un autre champ de recherches : la conception de médicaments basée sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme ciblé, ou en anglais le 'structure-based drug design'. Ce nouvel outil permit non seulement d'optimiser les séries d'inhibiteurs peptidomimétiques existantes mais aussi de développer de nouvelles familles de molécules non peptidiques.

Au cours de ce paragraphe, nous aborderons successivement ces différentes approches : nous détaillerons tout d'abord la conception d'inhibiteurs peptidomimétiques, technique puissante qui a permis la mise sur le marché des anti-protéases actuels. L'approche non peptidique sera ensuite présentée, montrant deux types de stratégies : l'optimisation de molécules chefs de file issues de criblages de chimiothèques, et le développement de composés imaginés sur base de la topologie tridimensionnelle du site actif de la protéase. Enfin, nous discuterons brièvement des inhibiteurs se liant de manière irréversible à l'enzyme.

I. Approche peptidomimétique ¹⁶²⁻¹⁶⁴

Comme nous venons de le mentionner, l'approche peptidomimétique est basée sur l'analogie avec les substrats naturels de la protéase, en particulier sur le site de clivage Phe*Pro, spécifique des protéases rétrovirales. Les inhibiteurs peptidomimétiques miment l'état de transition tétraédrique apparaissant lors de la réaction de protéolyse (Figure 2.8.).

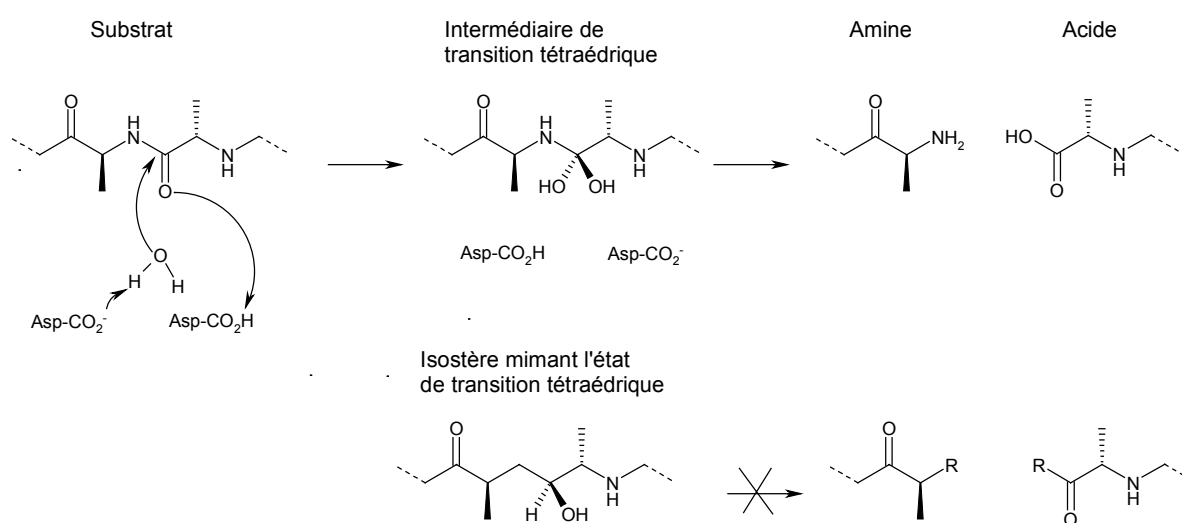
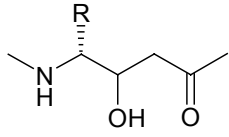
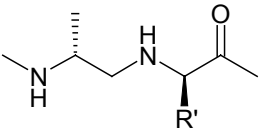
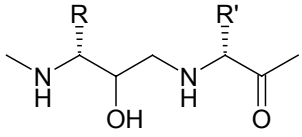
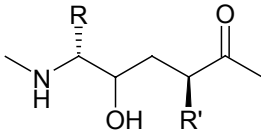
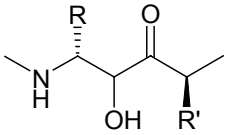
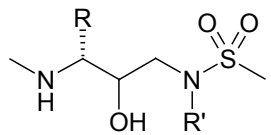
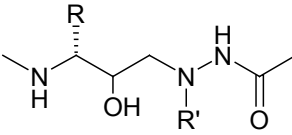
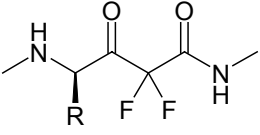
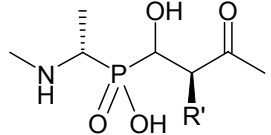


Figure 2.8. Intermédiaire de transition tétraédrique apparaissant lors de la réaction de protéolyse. L'isostère mimant cet état de transition n'est pas clivé.

Un échange isostérique au niveau de l'unité peptidique hydrolysable du substrat, permet d'éviter la réaction d'hydrolyse et conduit à différentes familles d'inhibiteurs selon le type d'isostère choisi. Dans le cas de la protéase du VIH-1, l'intermédiaire tétraédrique a, par exemple, été remplacé par une statine, une amide réduite, une hydroxyéthylamine, un hydroxyéthylène, un hydroxyméthylène, une α,α

difluorocétone, un phosphinate, un azapeptide, une hydroxyéthylsulfonamide, etc...(Tableau 2.4.).

Tableau 2.4. : Exemples d'analogues de l'état de transition utilisés dans la conception d'inhibiteurs peptidomimétiques de la protéase du VIH-1.

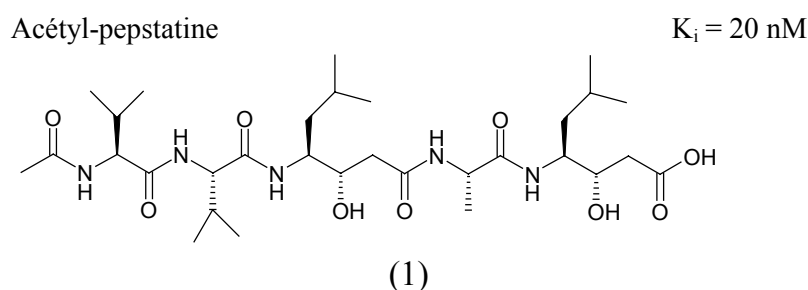
<p>statine</p> 	<p>amide réduite</p> 	<p>hydroxyéthylamine</p> 
<p>hydroxyéthylène</p> 	<p>hydroxyméthylène</p> 	<p>hydroxyéthylsulfonamide</p> 
<p>azapeptide</p> 	<p>difluorostatone</p> 	<p>phosphinate</p> 

A ce stade, les inhibiteurs gardent une analogie presque parfaite avec le substrat. Ceci leur confère une activité antienzymatique remarquablement élevée. Cependant, ce caractère peptidique prononcé engendre une mauvaise biodisponibilité *in vivo*. En effet, les inhibiteurs peptidiques sont rapidement métabolisés par les différents enzymes protéolytiques de l'organisme et n'atteignent donc pas leur cible en quantité suffisante. Pour améliorer leurs propriétés physico-chimiques et leur stabilité métabolique, des modifications successives peuvent être apportées à ces peptides, tant au niveau du squelette peptidique, qu'à celui des chaînes latérales. Ces inhibiteurs perdant peu à peu leur caractère peptidique, accroissent leur efficacité et leur spécificité, et limitent ainsi d'éventuels effets secondaires.

A titre d'exemple, nous illustrerons ces stratégies en présentant quelques inhibiteurs remarquables de la protéase du VIH-1, classés, pour la plupart, selon le type d'isostère utilisé.

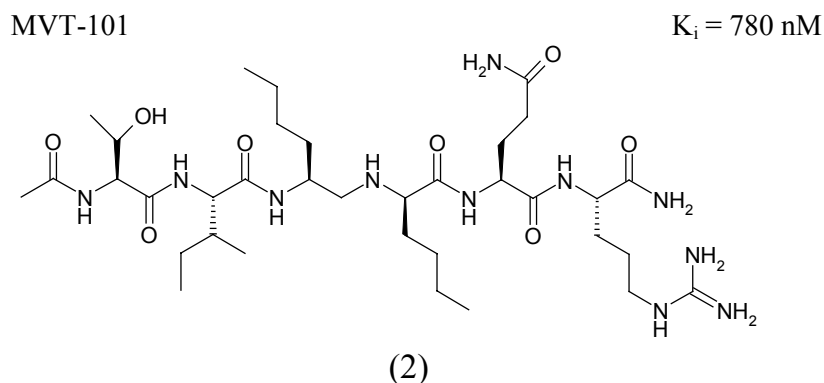
a. Statine

L'inhibition de la protéase du VIH-1 par la pepstatine A permet de rattacher sans équivoque cet enzyme à la famille des protéinases à acides aspartiques^{101,165}. C'est donc tout naturellement que les recherches se focalisèrent initialement sur l'isostère statine. Les inhibiteurs qui en découlèrent, par exemple l'acétyl-pepstatine (1), ont cependant une activité relativement faible^{166,167}. En effet, l'isostère statine ne permet pas d'introduire une chaîne latérale en P1', ce qui diminue les contacts hydrophobes avec la protéase. Nous verrons un peu plus loin que raccourcir l'isostère d'un carbone pour former l'isostère norstatine ou hydroxyméthylène permet de placer un résidu en P1', et d'augmenter l'activité inhibitrice.



b. Amide réduite

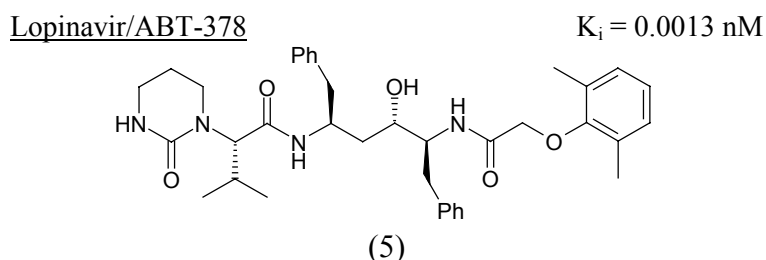
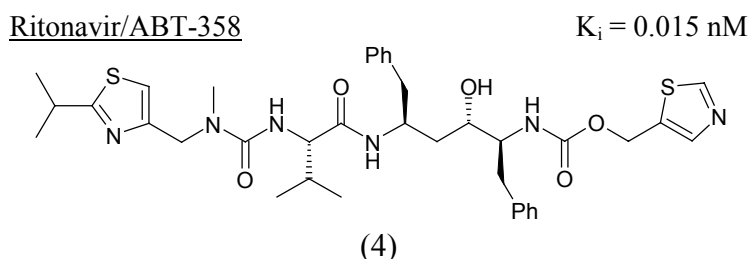
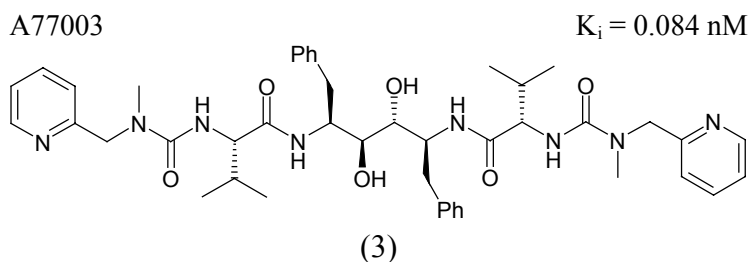
Le premier inhibiteur cocrystallisé avec la protéase, le composé MVT-101 (2)¹⁵⁸, possédait un isostère de type amide réduite. Cependant, l'absence du groupement hydroxyle permettant une interaction avec les aspartates catalytiques est en partie responsable du manque d'affinité de la protéase pour cette famille d'inhibiteurs. On peut néanmoins citer un contre-exemple récent : l'inhibiteur OE (Boc-Phe-CH₂CH₂NH-Phe-Glu-Phe-NH₂) possède une bonne activité anti-enzymatique ($K_i = 1.5 \text{ nM}$), l'interaction avec les aspartates catalytiques étant assurée par l'amine isostérique. L'absence de groupement hydroxyle central serait ici plutôt favorable car elle confère de la flexibilité au pseudo-peptide, ce qui expliquerait son activité contre certains mutants de la protéase¹⁶⁸.



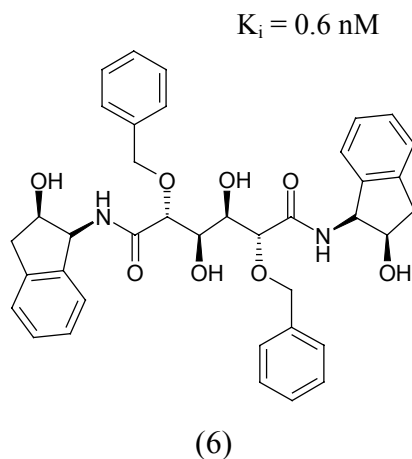
c. Inhibiteurs symétriques et pseudosymétriques

La protéase se présente sous forme d'un homodimère, les deux monomères identiques étant reliés par un axe de symétrie C₂. Très rapidement, les chercheurs ont voulu exploiter cette caractéristique structurale propre aux protéases rétrovirales, postulant que des inhibiteurs symétriques présenteraient une plus grande sélectivité¹⁶⁹. Par exemple, le composé symétrique A77003 (3) est sélectif et fait preuve d'une bonne activité antienzymatique mais est trop facilement métabolisé par l'organisme, ce qui diminue sa biodisponibilité. Des modifications systématiques au niveau des groupements situés en position P3 et P2' ont permis d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des dérivés de A77003¹⁷⁰⁻¹⁷². Ainsi, le remplacement des substituants pyridyles par des thiazoles, a augmenté la stabilité chimique de la molécule vis-à-vis des phénomènes oxydatifs, ce qui a conduit au composé pseudo-symétrique ABT-538, plus connu sous le nom de Ritonavir (4), commercialisé en mars 1996 par la firme pharmaceutique Abbott¹⁷³⁻¹⁷⁸. Le Ritonavir est un inhibiteur du cytochrome P450 3A4, qui est responsable de la métabolisation de nombreux médicaments, parmi lesquels on peut compter les autres antiprotéases actuels. Dès lors, il est intéressant de l'utiliser en combinaison avec d'autres inhibiteurs qui profiteront ainsi d'une durée de vie plus longue au sein de l'organisme¹⁷⁹.

Pour contrer l'apparition de mutations de certains résidus de la protéase sous la pression sélective du Ritonavir¹⁸⁰⁻¹⁸², les chercheurs d'Abbott ont mis au point le composé ABT-378, ou Lopinavir (5)¹⁸³⁻¹⁹², qui a été approuvé en octobre 2000. Le Lopinavir n'a qu'une durée de vie réduite au sein de l'organisme, il est donc toujours administré avec du Ritonavir sous une formulation unique appelée Kalétra[®].



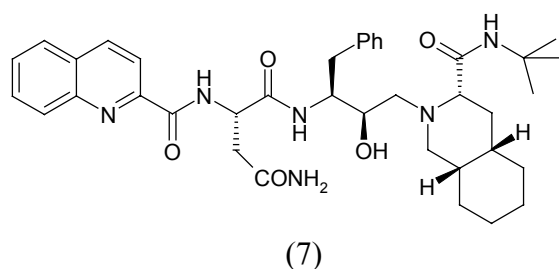
Une autre famille d'inhibiteurs symétriques dérive de l'acide mannarique^{193,194}. L'utilisation de cette source naturelle de carbohydrate facilite en effet la synthèse de ces composés possédant quatre centres asymétriques successifs, comme par exemple le composé (6). Il est intéressant de noter que bien que le composé (6) ait une activité antienzymatique élevée, son activité antivirale est assez faible ($EC_{50} = 100 \text{ nM}$). L'addition de deux fluors sur les phényles en position P1/P1' diminue quelque peu la puissance de l'inhibiteur sur la protéase ($K_i = 4.0 \text{ nM}$) tout en améliorant l'activité cellulaire ($EC_{50} = 30 \text{ nM}$).



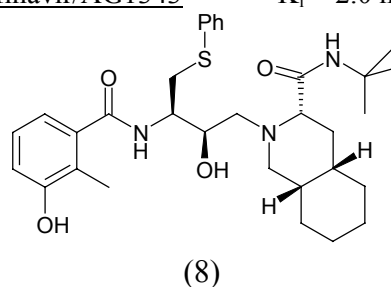
d. Hydroxyéthylamine

Le composé Ro31-8959, ou Saquinavir (7) est le premier inhibiteur de la protéase du VIH-1 à avoir été commercialisé (décembre 1995). Les chercheurs d'Hoffman-la-Roche ont basé leur approche sur l'analogie avec le substrat naturel contenant le site de clivage Phe*Pro, remplacé ici par une hydroxyéthylamine. La modification systématique des chaînes latérales et des substituants terminaux a mené à la découverte de ce composé très puissant mais de faible biodisponibilité¹⁹⁵.

Saquinavir/Ro31-8959

 $K_i = 0.12 \text{ nM}$ 

Nelfinavir/AG1343

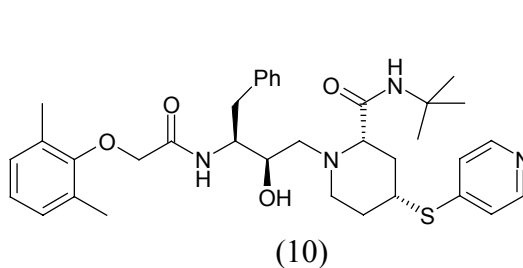
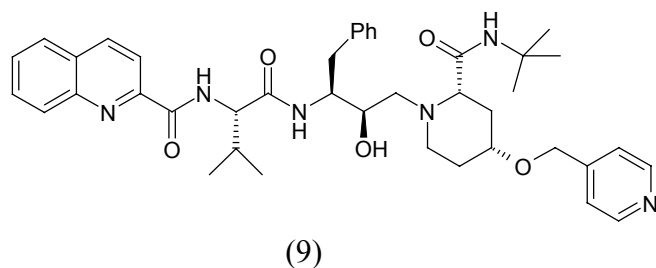
 $K_i = 2.0 \text{ nM}$ 

Le composé AG1343 ou Nelfinavir (8) résulte de l'optimisation du Saquinavir¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. En effet, la modification de la phénylalanine en S-phénylcystéine permet de meilleurs contacts hydrophobes au niveau des sous-sites S1/S3 de la protéase. L'adaptation consécutive du substituant P2 conduisit à la découverte du groupement clé hydroxytoluène, qui sera souvent repris dans les générations suivantes d'antiprotéases. Le Nelfinavir mésylate commercialisé en mars 1997 par la firme Agouron, possède une activité anti-virale comparable à celle du Saquinavir mais de meilleures propriétés pharmacocinétiques¹⁹⁹, dues à la diminution du caractère peptidique de cet inhibiteur. Egalement basé sur le Saquinavir, le Palinavir (BILA 2011 BS) (9) est un puissant inhibiteur de la protéase du VIH-1 et du VIH-2²⁰⁰, mais sa biodisponibilité est réduite²⁰¹.

Palinavir

 $K_i \text{ (VIH-1)} = 0.031 \text{ nM}$
 $K_i \text{ (VIH-2)} = 0.13 \text{ nM}$

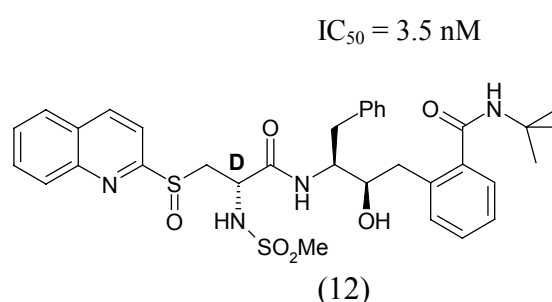
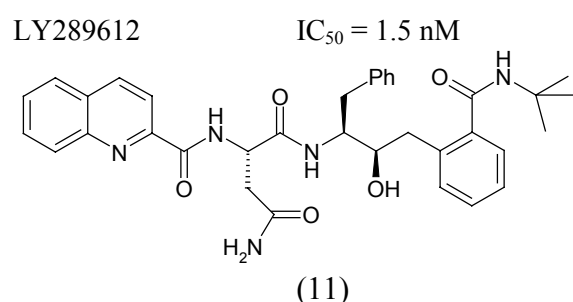
BILA 2185 BS

 $K_i \text{ (VIH-1)} = 0.006 \text{ nM}$
 $K_i \text{ (VIH-2)} = 0.023 \text{ nM}$


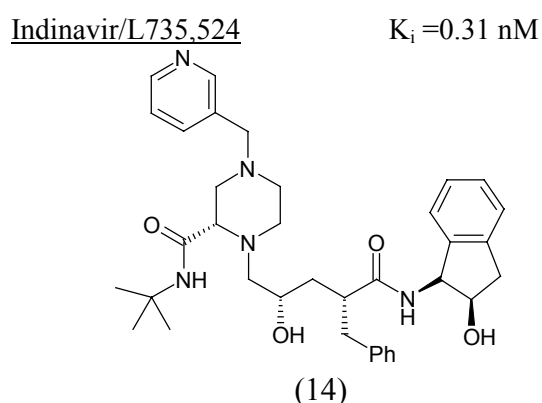
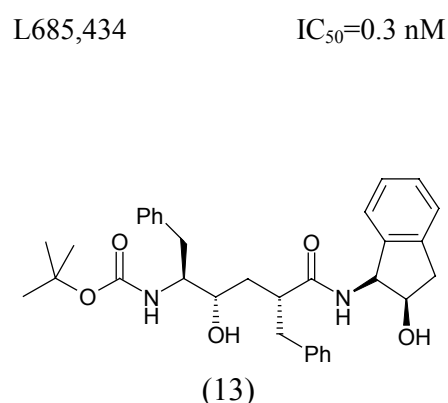
La cocrystallisation du Palinavir et de certains de ses dérivés avec la protéase ainsi que des études de modélisation moléculaire ont permis de pointer le composé BILA 2185 BS (10)^{202,203} caractérisé par un plus faible poids moléculaire, de bonnes propriétés pharmacocinétiques et une activité anti-enzymatique extrêmement élevée. Cependant, la toxicité de ce composé lui ôte toute perspective de développement clinique.

e. Hydroxyéthylène

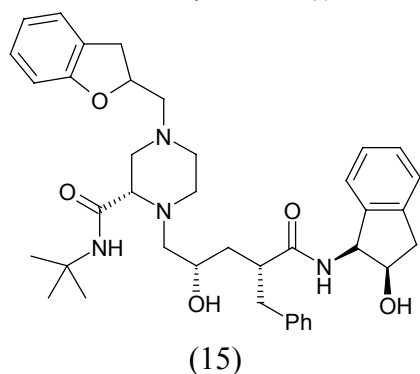
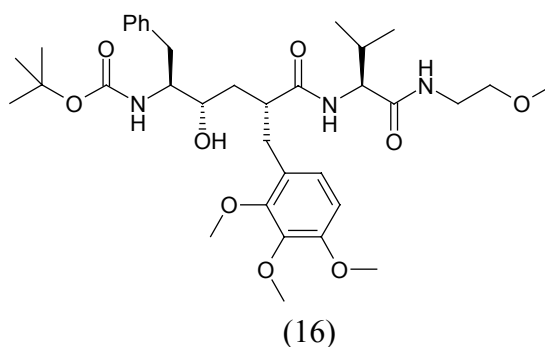
De nombreux inhibiteurs hydroxyéthyléniques sont basés sur le site de clivage Phe*Pro comme l'inhibiteur LY289612 (11)²⁰⁴ qui sert à l'élaboration du Nelfinavir (8). Pour garder l'affinité de la protéase pour un composé peptidomimétique comme le LY289612, tout en améliorant ses propriétés pharmacocinétiques, nous avons vu qu'il est intéressant de diminuer son caractère peptidique. Une solution consiste à remplacer un acide aminé naturel L par un acide aminé non naturel D. Cette stratégie a été suivie dans l'optimisation du composé LY289612, en introduisant, par exemple, un analogue distant de la D-cystéine en position P2 (inhibiteur (12))^{205,206}.



Un autre inhibiteur intéressant basé sur cet isostère est le composé L685,434 (13)²⁰⁷, précurseur de l'inhibiteur L735,524 plus connu sous son nom générique d'Indinavir (14)²⁰⁸⁻²¹¹.



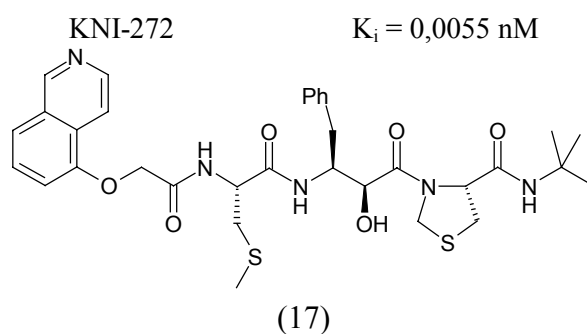
L'incorporation d'une amine basique au sein de son squelette peptidomimétique confère en effet à l'Indinavir une activité antivirale ainsi que des propriétés pharmacocinétiques remarquables, ce qui permit à la firme Merck de le commercialiser dès mars 1996. Afin d'améliorer la stabilité métabolique de l'Indinavir²¹²⁻²¹⁵, ou d'améliorer son activité contre diverses souches mutantes du virus²¹⁶⁻²¹⁸, une optimisation systématique des différents groupements et sites de métabolisation a été entreprise, notamment à l'aide de techniques combinatoires. Elle a mené à l'identification du composé MK-944a (L-756,423) (15) qui en plus d'une excellente activité anti-virale, fait preuve d'un meilleur profil pharmacocinétique que l'Indinavir²¹⁹. Les essais cliniques ont cependant été abandonnés car le MK-944a ne possède pas une activité suffisante contre les souches mutantes de la protéase.

MK-944a/L-756,423 $IC_{50} = 0.18 \text{ nM}$ Lasinavir/BMS-234475 $IC_{50} = 1 \text{ nM}$ 

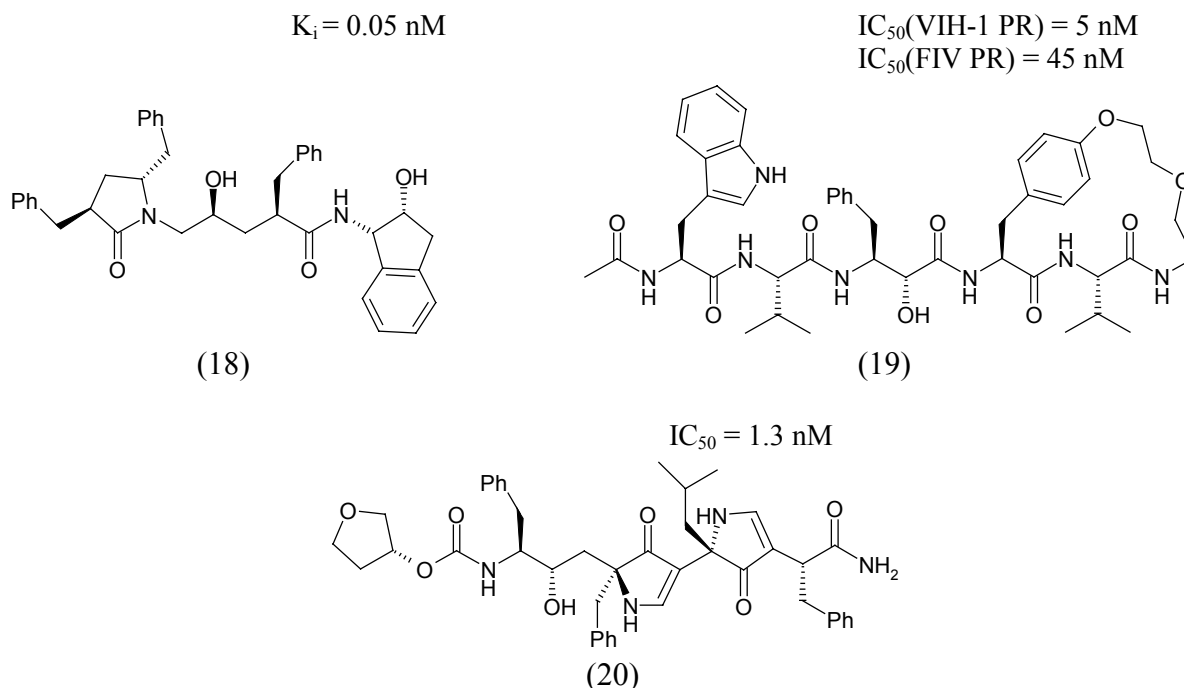
Enfin, on peut encore citer d'autres inhibiteurs appartenant à cette famille d'hydroxyéthylène : ainsi le composé QF34^{220,221} est très puissant contre la forme sauvage de la protéase du VIH-1 avec une constante d'inhibition de 0.02 nM, tout en gardant une activité inférieure au nanomolaire sur les protéases multirésistantes apparaissant au cours de thérapies utilisant le Saquinavir, l'Indinavir, le Ritonavir ou le Nelfinavir. Cette propriété exceptionnelle serait due à un mode de liaison inhabituel au sein du site actif de la protéase²²², les chaînes latérales de cet inhibiteur peptidique se positionnant plutôt entre les différents sous-sites, ce qui le rend moins sensible aux mutations. Le composé BMS-234475 (CGP-61755) ou Lasinavir (16), quant à lui, a été inspiré par des recherches antérieures portant sur l'inhibition de la rénine. L'exploration systématique des substituants optimaux en position P1' a mené à l'identification d'un groupement triméthoxyphényl qui permettrait d'améliorer la biodisponibilité de l'inhibiteur tout en conservant une bonne activité anti-enzymatique²²³⁻²²⁵.

f. Hydroxyméthylène (Norstatine)

Nous avons vu qu'une statine ne permettait pas d'introduire un groupement en position P1', ce qui diminue l'affinité de la protéase pour cette classe d'inhibiteurs. En raccourcissant la statine d'un carbone, on obtient l'isostère norstatine ou hydroxyméthylène qui permet une interaction optimale entre l'inhibiteur et chaque sous-site de la protéase. A partir de l'analogie avec les substrats contenant les sites de clivage Phe/Tyr*Pro, des chercheurs japonais de l'université de Kyoto ont mis au point un inhibiteur extrêmement puissant, le composé KNI-272 (17) qui possède une constante d'inhibition proche du picomolaire²²⁶⁻²³¹. Cette activité remarquable est attribuée entre autres²³² au fait que cet inhibiteur est préorganisé dans sa conformation bioactive, c'est-à-dire dans la conformation qu'il adoptera lors de son interaction avec la protéase²³³⁻²³⁵.

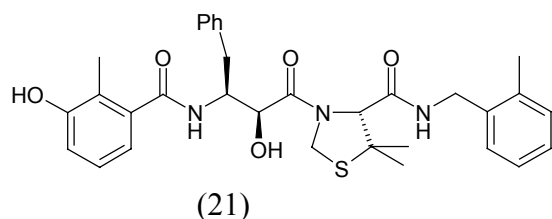


Stabiliser la conformation d'un peptide ou d'un pseudopeptide sous sa forme bioactive est d'ailleurs une des stratégies exploitée lors de la mise au point d'inhibiteurs peptidomimétiques. Dans le cas de l'interaction avec la protéase, substrats comme inhibiteurs adoptent une conformation étendue. L'introduction de pontages entre différentes parties de ces molécules rigidifie le peptide, tout en le contraignant à adopter la conformation souhaitée. On peut ainsi cycliser certaines régions du squelette peptidique^{236,237}, comme en témoigne le composé (18)²³⁸, ou relier entre elles différentes chaînes latérales produisant alors des structures macrocycliques²³⁹⁻²⁴⁸. L'inhibiteur (19) en est un bon exemple : il est actif non seulement contre la protéase du VIH-1 mais aussi contre la protéase du virus de l'immunodéficience féline (FIV) qui sert de modèle de protéase multirésistante^{249, 250}. Enfin, on peut citer la famille des oligopyrrolinones²⁵¹⁻²⁵³ dont le squelette est constitué de structures cycliques (par exemple, le composé 20). Ces composés sont plus résistants au métabolisme que leurs analogues peptidiques et disposent d'un transport élevé au sein des cellules infectées²⁵⁴.

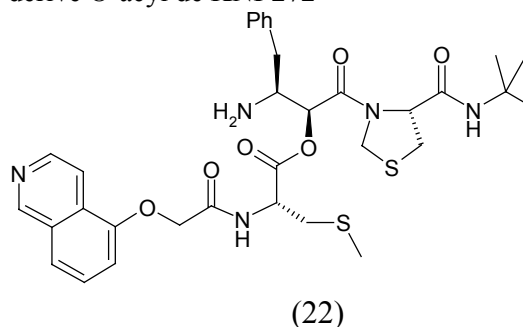


Mais revenons au composé KNI-272 : les essais cliniques ont montré que malgré sa puissance *in vitro*, cet inhibiteur n'a qu'une faible activité antirétrovirale²⁵⁵⁻²⁵⁷. En effet, son temps de vie au sein de l'organisme est limité car il se lie fortement aux protéines plasmatiques²⁵⁸ et est rapidement métabolisé^{259,260}. Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques et le profil de résistance de cette famille d'inhibiteurs hydroxyméthyléniques, diverses modifications ont mené à l'identification du composé SM-319777 anciennement connu sous le nom de JE-2147 (21)²⁶¹. Celui-ci est issu d'une stratégie visant, d'une part, à diminuer le poids moléculaire de KNI-272 et d'autre part à augmenter sa symétrie afin d'occuper de manière optimale les différents sous-sites symétriques de la protéase. On retrouve ainsi en position P2, le groupement hydroxytoluène du Nelfinavir, tandis qu'en position P2' un autre groupement aromatique fait face²⁶². JE-2147 conserve une activité raisonnable et un meilleur profil pharmacocinétique que KNI-272^{263,264}. Il est en outre un assez bon inhibiteur des protéases mutantes. Des dérivés plus actifs de JE-2147 sont actuellement en développement²⁶⁵.

SM-319777 (JE-2147) $K_i = 0.33 \text{ nM}$

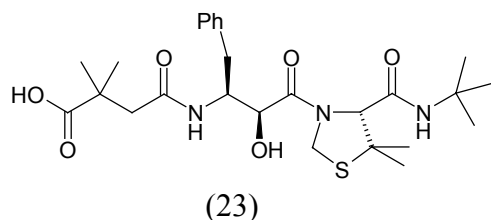


dérivé O-acyl de KNI-272

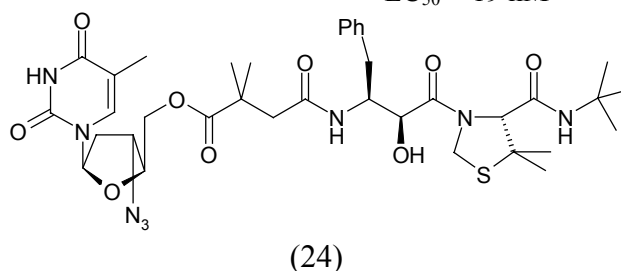


Une autre stratégie a également été exploitée pour améliorer la biodisponibilité de KNI-272 et de ses dérivés : celle des 'pro-drogues'. Il est en effet possible de générer une 'pro-drogue' (22) en greffant un substituant acyle, par exemple, sur le groupement hydroxyle central de KNI-272, ce qui augmentera la solubilité de l'inhibiteur en milieu aqueux, et donc sa biodisponibilité. Lors de leur incubation à 37°C et à pH 7.4, ces dérivés se convertissent spontanément sous leur forme active, le groupement acyle étant transféré par un réarrangement intramoléculaire du côté N-terminal de l'inhibiteur²⁶⁶⁻²⁶⁸. Une étape encore plus élaborée de cette stratégie utilise des 'doubles-drogues'^{269,270}. Dans ce cas, c'est un inhibiteur de la transcriptase inverse, l'AZT, qui est associé à un anti-protéase. Prenons par exemple, le composé KNI-413 (23) : il possède une activité antienzymatique raisonnable mais passe difficilement à travers la membrane cellulaire. Lorsque l'on greffe l'AZT à la suite du groupement P2 pour former le composé KNI-684 (24), on n'observe plus d'inhibition *in vitro* de la protéase seule. Par contre, l'activité cellulaire est meilleure que celle de l'AZT ou de KNI-413 pris séparément, ce qui indiquerait l'existence d'un clivage intracellulaire libérant les deux inhibiteurs²⁷¹⁻²⁷³.

KNI-413 $IC_{50} < 5 \text{ nM}$
 $EC_{50} = 52 \text{ } \mu\text{M}$



KNI-684 $IC_{50} > 5 \text{ } \mu\text{M}$
 $EC_{50} = 19 \text{ nM}$



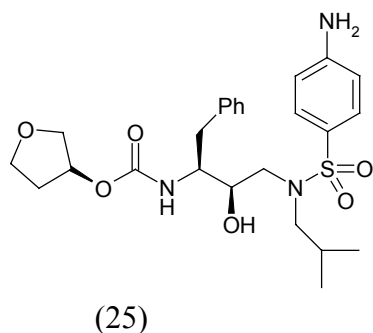
Outre la famille de composés dérivés du KNI-272, on peut également mentionner les travaux d'une autre équipe japonaise, de la compagnie Sankyo, portant sur le même isostère appelé ici AHPBA pour 3(S)-Amino-2(S)-Hydroxy-4-PhenylButanoic Acid. Les composés issus de ces recherches ont de fortes similitudes structurales avec la famille de KNI-272 et ont également une activité antienzymatique importante²⁷⁴⁻²⁷⁹. Des études de modélisation moléculaire ont montré que ces deux séries d'inhibiteurs adoptaient le même mode de liaison au sein du site actif de la protéase²⁸⁰. Une autre famille comprenant l'isostère norstatine a été découverte par des chercheurs de l'université de Prague grâce à une approche combinatoire. Les meilleurs représentants de cette famille ont des activités de l'ordre du picomolaire aussi bien vis-à-vis de la protéase sauvage que de nombreux mutants^{281,282}.

g. Hydroxyéthylsulfonamide

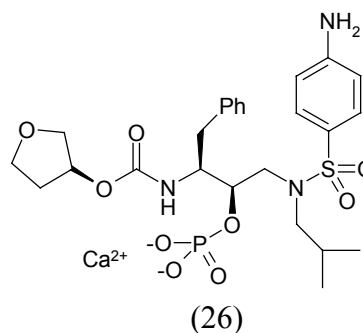
Les inhibiteurs peptidomimétiques présentent généralement un poids moléculaire élevé, ce qui handicape leur biodisponibilité. La firme pharmaceutique Vertex a concentré ses efforts dans la conception d'inhibiteurs de la protéase de faible poids moléculaire. S'appuyant sur les informations structurales obtenues par cristallographie et caractérisant la liaison entre la protéase du VIH-1 et ses inhibiteurs (structure-based design), une optimisation des interactions avec les aspartates catalytiques et la molécule d'eau servant de relais entre le peptide et les flaps de la protéase a été entreprise. Parmi les candidats potentiels, le composé VX-478 ou Amprénavir (25), a été retenu car il est préorganisé sous sa forme bioactive²⁸³. Son activité antienzymatique et antivirale ainsi qu'un bon profil pharmacocinétique et une faible toxicité ont justifié sa commercialisation en mai 1999²⁸⁴⁻²⁹¹.

Par ailleurs, le Fosamprénavir (GW433908) (26), une pro-droque de l'Amprénavir est arrivée récemment sur le marché (octobre 2003). Cette pro-droque, dont le mécanisme est basé sur le clivage d'un phosphate greffé sur le groupement hydroxyle central, fait preuve d'une meilleure solubilité en milieu aqueux, ce qui facilite sa formulation, et cause moins d'effets secondaires²⁹²⁻²⁹⁴.

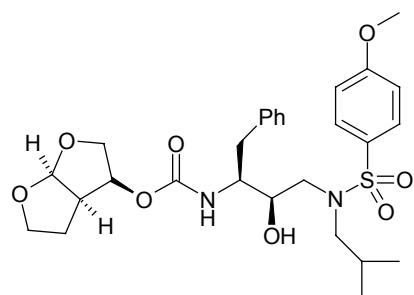
Amprénavir/VX-478 $K_i = 0.6 \text{ nM}$



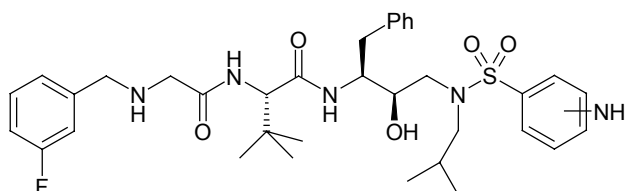
Fosamprénavir/GW433908



Des analogues de l'Amprénavir ont été développés à l'Université de l'Illinois de Chicago. Afin d'obtenir une interaction optimale avec les aspartates 29 et 30 de l'enzyme, une étude des substituants en position P2 a été entreprise. Elle a permis de pointer divers hétérocycles intéressants²⁹⁵. Parmi eux, le groupement bis-THF a été retenu au sein du composé UIC-94003 ou TMC 126 (27). Il confère à ce dernier une excellente activité antivirale sur de nombreuses souches sauvage et mutantes du virus²⁹⁶⁻²⁹⁹. L'optimisation systématique des groupements P'1 et P'2 a permis d'obtenir des molécules extrêmement puissantes, caractérisées par des constantes d'inhibition inférieures au picomolaire³⁰⁰. Un analogue du TMC 126, le TMC 114 est actuellement en développement clinique avancé (Phase II)³⁰¹.

TMC 126/UIC-94003 $K_i = 0.015$ nM

(27)

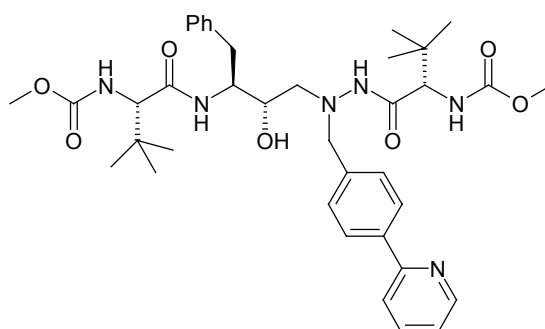
DPC 681 (*m*-NH₂)
DPC 684 (*p*-NH₂) $K_i = 0.012$ nM
 $K_i = 0.021$ nM

(28)

En se basant sur le Saquinavir, la firme Searle a développé des inhibiteurs contenant l'isostère hydroxyéthylurée³⁰². Par exemple, l'inhibiteur SC-52151 possède un K_i de 3 nM et une bonne activité antivirale ($EC_{50} = 17-68$ nM)³⁰³. Afin d'améliorer le profil pharmacocinétique de tels composés, l'hydroxyéthylurée fut remplacée par l'isostère hydroxyéthylsulfonamide³⁰⁴⁻³⁰⁶. En collaboration avec Searle, la compagnie Dupont a optimisé cette série d'inhibiteurs pour proposer le DPC 681 et le DPC 684 (28) qui présentent une très bonne activité antivirale sur de nombreuses souches mutantes du virus³⁰⁷.

h. Azapeptide

A partir de l'étude de peptides pseudo-symétriques³⁰⁸, il a été postulé que l'introduction d'un analogue de l'état de transition de type aza dipeptide pouvait simplifier la synthèse de tels composés par la suppression d'un centre asymétrique³⁰⁹.

Atazanavir/BMS-232632 $K_i = 2.7$ nM

(29)

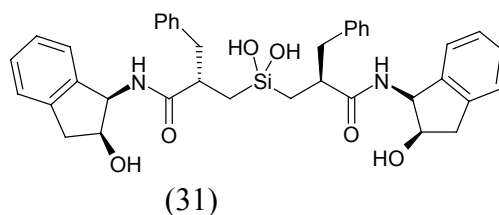
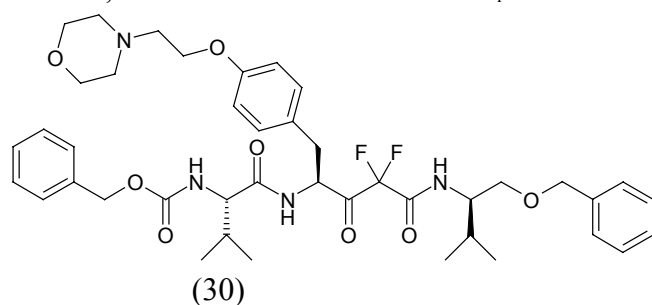
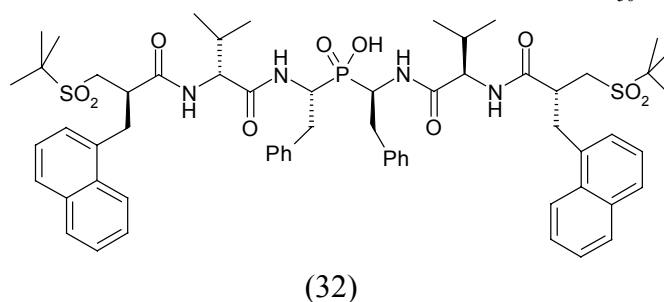
Des études de modélisation moléculaire ont permis l'identification du composé BMS-232632 ou Atazanavir (29)³¹⁰ qui combine une bonne activité anti-enzymatique et cellulaire³¹¹, une faible toxicité et une résistance aux mutations de la protéase

engendrées par les autres inhibiteurs commerciaux³¹². Ces caractéristiques ont permis la commercialisation de l'Atazanavir en juin 2003.

i. Difluorostatone et autres isostères inorganiques

Plusieurs inhibiteurs puissants contenant des bioisostères de type difluorocétone³¹³⁻³¹⁵ et difluorostatone^{316,317} ont été proposés. Parmi eux, le composé MDL 74,695 (30)³¹⁸ qui possède cependant une faible biodisponibilité et engendre rapidement une résistance virale³¹⁹. Une autre étude porte sur des analogues symétriques de l'Indinavir dans lequel l'isostère est modifié en silane diol, comme, par exemple, le composé (31)³²⁰. Enfin, la molécule symétrique (32) est un exemple représentatif d'inhibiteur possédant un isostère phosphinate³²¹.

MDL 74,695

 $K_i = 1 \text{ nM}$ $K_i = 2.7 \text{ nM}$  $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$ 

II. Approche non peptidique

L'émergence d'inhibiteurs peptidomimétiques de la protéase du VIH-1, au milieu des années 90 a révolutionné le traitement du SIDA. En effet, associés aux inhibiteurs de la transcriptase inverse, ils permettent de retarder durablement

l'apparition des symptômes sévères associés à la maladie et donc d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients. Cependant, on se rendit vite compte qu'il fallait mettre certains bémols à ce grand succès thérapeutique. Par leur nature peptidique ou pseudo-peptidique, beaucoup d'inhibiteurs commerciaux de la protéase ont une trop faible biodisponibilité et de piètres propriétés pharmacocinétiques. Leur coût élevé, les effets secondaires qu'ils engendrent et surtout l'apparition de souches virales mutantes résistantes au traitement peuvent rapidement anéantir tout espoir de guérison. Dès lors, il est indispensable de concevoir de nouvelles générations de médicaments, ayant une nature non peptidique et gardant une efficacité face aux protéases mutantes.

Une des stratégies adoptées pour découvrir des chefs de file de nature non peptidique est le criblage et l'évaluation biologique de banques de données de produits chimiques ou naturels ('screening'). L'autre stratégie se base directement sur la topologie tridimensionnelle du site actif ciblé ('structure-based rational design').

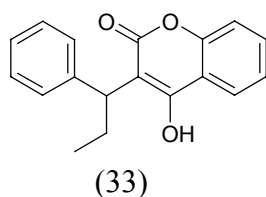
a. Screening

Un exemple représentatif issu de cette approche est le composé PNU-140690 ou Tipranavir (34)³²², un des inhibiteurs de la protéase qui devrait être approuvé sous peu en vue de sa commercialisation. Après un large screening de leur chimiothèque, les chercheurs de Pharmacia et Upjohn ont identifié deux coumarines, tout d'abord la Warfarine, un anticoagulant, puis la Phenprocoumon (33)³²³. Bien que faiblement actives contre la protéase du VIH-1, les deux coumarines étaient connues pour leurs bonnes propriétés pharmacocinétiques ; ce noyau pouvait donc servir de point de départ pour le développement d'une nouvelle famille d'antiprotéases non peptidiques. Par un processus itératif d'optimisation de cette série³²⁴⁻³³⁴, on obtint le Tipranavir^{335, 336}, un inhibiteur de la protéase exceptionnel par son activité antivirale, aussi bien contre la souche sauvage du virus que contre les mutants apparaissant suite à la pression sélective des médicaments existants³³⁷⁻³³⁹. La résistance au Tipranavir lui-même est assez lente à se développer. Par ailleurs, cet inhibiteur provoque peu d'effets secondaires et agit en synergie avec les autres anti-viraux³⁴⁰, ce qui en fait un candidat prometteur pour la génération suivante de médicaments contre le VIH.

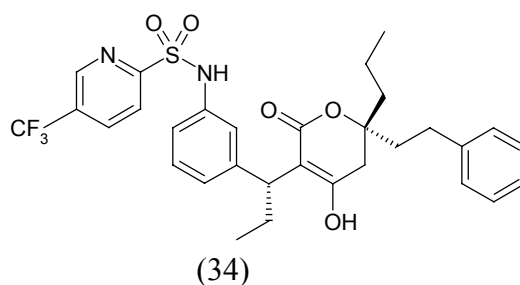
Parallèlement au développement du Tipranavir, une approche semblable a été suivie par la compagnie Parke-Davis^{341,342}. Suite au criblage à grande échelle de leur chimiothèque, les chercheurs de cette firme pharmaceutique ont identifié en plus de coumarines dérivées de la Warfarine³⁴³, une hydroxypyrrone, PD 107067 (35), qui servit de chef de file pour la conception d'inhibiteurs non peptidiques de la protéase³⁴⁴.

L'optimisation successive de cette molécule³⁴⁵⁻³⁵¹ aboutit notamment à l'évaluation préclinique du composé PD 178390 (36), qui répond également aux exigences d'activité vis-à-vis du virus sauvage et de ses mutants, de biodisponibilité, de non toxicité, etc...³⁵²⁻³⁵⁵ Cette molécule s'apparente d'ailleurs fortement au Tipranavir et possède le même mode de liaison au sein de la protéase.

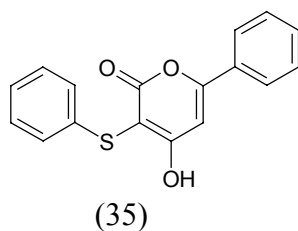
Phenprocoumon $IC_{50} = 1\mu M$



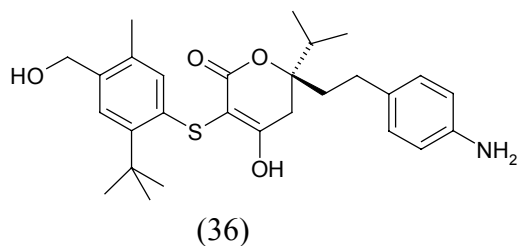
Tipranavir/PNU-140690 $K_i = 0.008\text{ nM}$



PD 107065 $IC_{50} = 3\mu M$



PD 178390 $K_i = 0.11\text{ nM}$



La cristallographie et la modélisation moléculaire jouèrent un rôle clé dans la conception de ces inhibiteurs^{322,323,347,356,357}. Elles révélèrent un mode d'interaction original avec la protéase. En effet, comme dans le cas des inhibiteurs peptidomimétiques, le groupement hydroxyl branché sur le noyau coumarinique interagit avec les aspartates catalytiques. Tout comme les substrats naturels de la protéase, les inhibiteurs peptidomimétiques forment également une interaction clé avec les résidus Ile50/150 localisés au niveau des flaps de l'enzyme par l'intermédiaire d'une molécule d'eau structurale. Par contre, les inhibiteurs dérivés des coumarines interagissent directement avec ces résidus en déplaçant la molécule d'eau structurale, ce qui se traduit par un gain entropique et une augmentation de la spécificité de ces inhibiteurs (Figure 2.9.). Nous verrons dans le paragraphe suivant que ce mode de liaison caractérise aussi d'autres familles d'inhibiteurs non peptidiques, comme celle des urées cycliques.

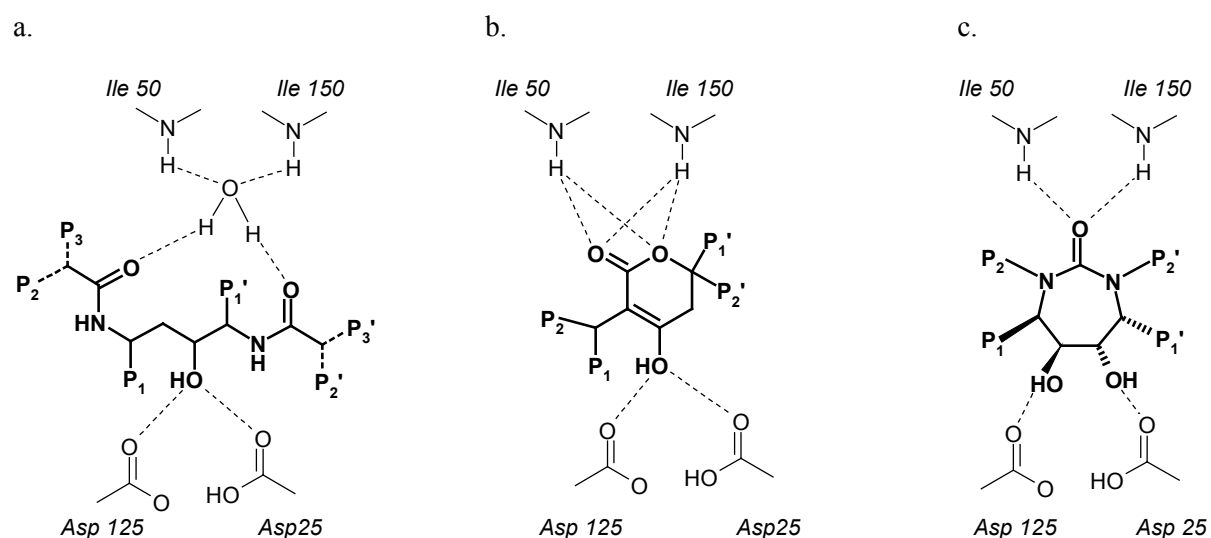


Figure 2.9. Interactions entre le site actif de la protéase et des inhibiteurs a. peptidomimétiques, b. non peptidiques issus de la famille des coumarines, c. non peptidiques issus de la famille des urées cycliques. Les composés non peptidiques forment directement des ponts hydrogène avec les résidus 50/150 des flaps, tandis que les peptidomimétiques interagissent avec les flaps par l'intermédiaire d'une molécule d'eau structurale.

b. Structure-based rational design

L'approche de la firme pharmaceutique Merck dans sa conception d'urées cycliques illustre parfaitement les stratégies de conception rationnelle de médicaments basées sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme ciblée³⁵⁸⁻³⁶⁰. Partant de leurs études sur l'inhibition de la protéase par des diols peptidomimétiques symétriques (Figure 2.10.a.) , les chercheurs de Merck ont postulé qu'une orientation vers des molécules non-peptidiques permettrait de surmonter plus facilement les problèmes de biodisponibilité. Dans cette optique, ils ont étudié les structures cristallographiques de la protéase complexée aux inhibiteurs peptidiques et ont pointé une caractéristique commune à tous ces complexes : l'existence d'une molécule d'eau structurale tétracoordinée spécifique aux protéases rétrovirales et servant de relais entre l'inhibiteur et les isoleucines 50/150 localisées aux sommets des flaps (Figure 2.9.a.). Ils émirent l'hypothèse que le déplacement de cette molécule d'eau structurale par une fonction chimique propre à l'inhibiteur serait favorable d'un point de vue énergétique, et apporterait une certaine spécificité. De plus, le passage de composés peptidomimétiques linéaires et flexibles à des molécules cycliques plus contraintes devait entraîner un gain entropique non négligeable. La mise au point d'un pharmacophore (Figure 2.10.b.) reprenant les caractéristiques essentielles à l'inhibition de la protéase par des molécules peptidomimétiques (distance entre les groupements P₁/P₁', présence d'un groupement hydroxyle interagissant avec les aspartates

catalytiques,...) permet de cribler virtuellement une banque de données tridimensionnelle.

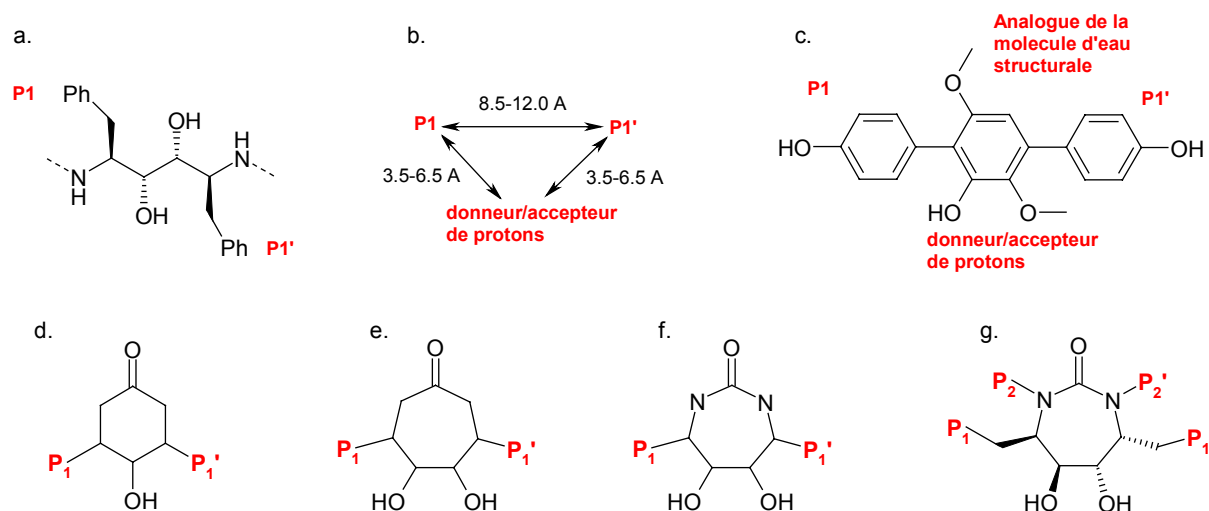


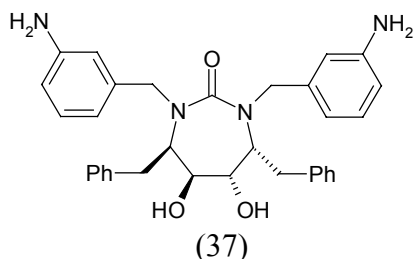
Figure 2.10. Stratégie utilisée lors de la conception rationnelle d'inhibiteurs de la protéase de type urées cycliques. En voici les étapes successives: a. inhibiteurs peptidomimétiques de type diol symétrique. b. pharmacophore utilisé pour identifier une molécule non peptidique, c. molécule issue du criblage virtuel, d. noyau cyclohexanone, e. noyau cycloheptanone ; incorporation de la fonction diol, f. urée cyclique, g. détermination de la stéréochimie des substituants (D'après Lam *et al.*³⁵⁸).

Cette recherche identifia une molécule tricyclique dont le noyau benzénique central pouvait accommoder aussi bien une fonction chimique mimant la molécule d'eau structurale qu'un donneur/accepteur de proton pouvant interagir avec les résidus catalytiques (Figure 2.10.c.). Cependant, les chercheurs se tournèrent plutôt vers des structures de type cyclohexanone qui permettent plus de liberté dans l'orientation des substituants (Figure 2.10.d.). Dans le but de disposer d'une fonction diol supplémentaire pour interagir avec les aspartates catalytiques, on élargit ensuite le cyclohexane à un cycloheptane (Figure 2.10.e.). Le choix d'une fonction urée reposa à la fois sur un critère d'accessibilité synthétique et sur le fait qu'une urée est un meilleur accepteur de proton qu'une cétone et peut dès lors former des ponts hydrogène plus forts avec l'enzyme (Figure 2.10.f.). Enfin, l'utilisation des outils de modélisation moléculaire conduisit à la prédiction de la stéréochimie³⁶¹ et des conformations optimales pour les différents substituants P1, P2, P1', P2' ainsi que pour le diol (Figure 2.10.g.), ce qui fut confirmé par des études cristallographiques³⁶².

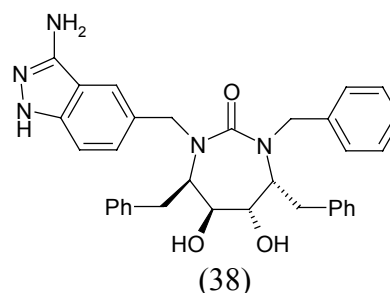
Cette stratégie conduisit à la découverte d'inhibiteurs non peptidiques de la protéase très puissants^{363, 364}. On peut attribuer cette réussite à différents facteurs : tout d'abord, les urées cycliques sont préorganisées dans leur conformation bioactive, il n'y

a donc pas de coût entropique à payer pour une éventuelle réorganisation lors de la liaison ; le déplacement de la molécule d'eau est également favorable d'un point de vue thermodynamique ; la structure de l'urée cyclique lui permet de placer les différents substituants de manière optimale dans les différents sous-sites enzymatiques. Par un processus d'optimisation itératif, continuellement aidé des outils de modélisation moléculaire et de cristallographie, divers composés ont été proposés³⁶⁵⁻³⁷⁰. Ainsi, l'inhibiteur DMP 450 encore appelé Mozenavir (37)³⁷¹ a fait l'objet d'études cliniques avancées. Possédant une bonne activité anti-virale, des profils de pharmacocinétique et de résistance adéquats, il a finalement été laissé de côté dans le processus de commercialisation pour des problèmes de métabolisme. Des modifications ultérieures furent proposées en P2 et P2'^{372,373} et dans une moindre mesure en P1 et P1'³⁷⁴ ; il s'avéra qu'une rupture de la symétrie laisserait plus de liberté pour trouver un compromis entre activité, pharmacocinétique, métabolisme, solubilité, etc...³⁷⁵⁻³⁷⁸ Ainsi, des composés comme le DMP 850 (38)³⁷⁹ sont représentatifs de cette troisième génération d'urées cycliques ayant atteint un développement clinique³⁸⁰.

Mozenavir/DMP 450 $K_i = 0.28 \text{ nM}$

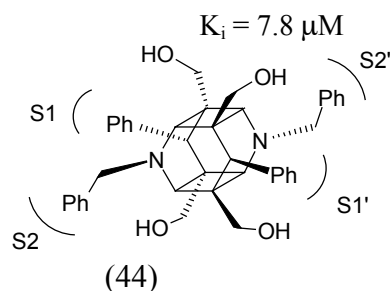
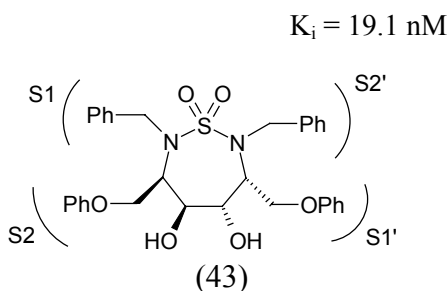
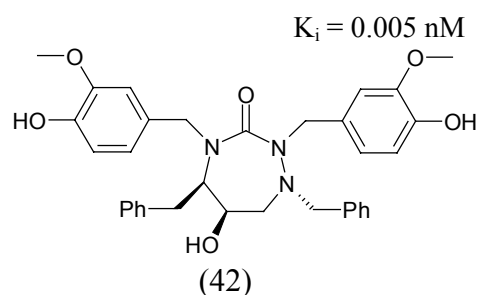
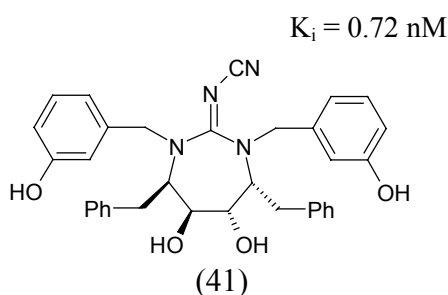
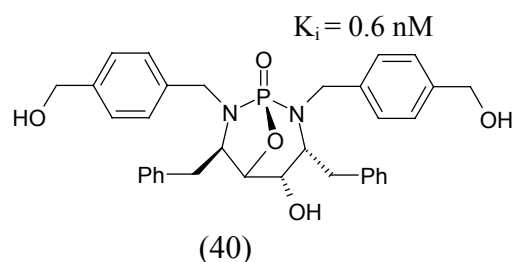
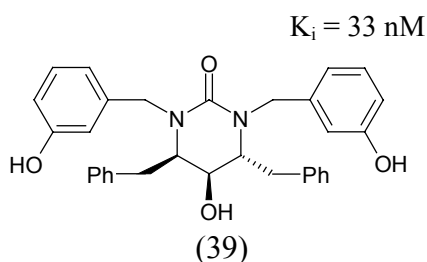


DMP 850 $K_i = 0.031 \text{ nM}$



Sur le principe des urées cycliques, plusieurs autres familles d'inhibiteurs non-peptidiques furent développées. Ainsi, Merck poursuivit un moment la conception de tétrahydropyrimidinones³⁸¹⁻³⁸³, de cyanoguanines cycliques^{384,385} ou d'analogues phosphoramides (par exemple, respectivement les composés 39, 40 et 41)³⁸⁶ ; la cyclisation d'aza peptides linéaires chez Abbott conduisit à des dérivés aza d'urées cycliques très puissants mais de faible biodisponibilité comme le composé (42) qui furent l'objet de nombreuses études théoriques^{387,388}. Certains groupes développèrent également des sulfamides³⁸⁹ ou des sulfones cycliques³⁹⁰. Il est intéressant de noter que la série des sulfamides cycliques, avec par exemple le composé (43), ne suit pas les mêmes relations de structure/affinité que les urées cycliques classiques^{391,392}. En effet, des études de cristallographie montrent un mode de liaison au sein du site actif de l'enzyme différent de celui des urées cycliques³⁹³. Enfin, on peut citer pour leur originalité les travaux d'une équipe allemande qui utilise des structures en forme de

cage pour orienter correctement les divers substituants dans les sous-sites correspondants (composé 44)³⁹⁴⁻⁴⁰⁰.



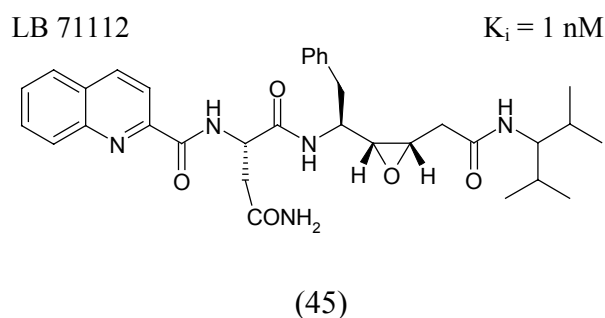
III Approche irréversible

Les inhibiteurs peptidomimétiques ou non peptidiques que nous venons de citer interagissent tous avec la protéase du VIH-1 de manière réversible. La présence d'aspartates catalytiques permet d'envisager une approche alternative : l'inhibition irréversible. En effet, ces résidus sont susceptibles de former des liaisons covalentes avec certaines fonctions réactives comme des époxydes; c'est ainsi que l'inactivation de la protéase par le composé 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)propane ou EPNP¹⁰³, permet de la classer dans la catégorie des protéases à acides aspartiques. Par une telle stratégie, on pourrait théoriquement endiguer le problème de résistance virale. En effet, les résidus catalytiques ciblés ne peuvent muter sans provoquer une perte totale de l'activité enzymatique. Cependant, cette approche reste assez marginale car les

inhibiteurs irréversibles, pour la plupart intrinsèquement réactifs, présentent souvent un problème de sélectivité, étant donné qu'ils risquent de réagir avec d'autres molécules biologiques avant de rencontrer l'enzyme ciblée. On peut néanmoins relever quelques inhibiteurs irréversibles peptidomimétiques ou non peptidiques.

a. Inhibiteurs peptidomimétiques

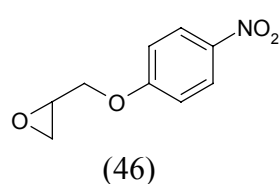
Une équipe coréenne s'est intéressée à la modification d'inhibiteurs peptidomimétiques classiques en composés irréversibles⁴⁰¹⁻⁴⁰⁵. L'ajout d'une fonction époxyde *cis* correctement orientée a mené par exemple au dérivé LB 71116 (45)⁴⁰³, dont certains analogues ont fait l'objet d'une évaluation préclinique.



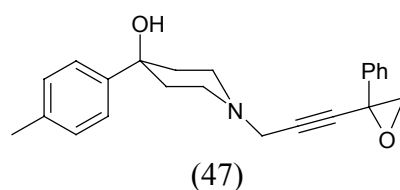
b. Inhibiteurs non peptidiques

Parmi les tout premiers inhibiteurs dirigés contre la protéase, on retrouve L'EPNP (46)^{103,406} et la cerulénine, un antibiotique antimycosique⁴⁰⁷. Par la suite, des chercheurs californiens se focalisèrent sur les dérivés de l'halopéridol, un inhibiteur réversible non peptidique de la protéase issu d'un criblage virtuel d'une banque de données tridimensionnelles. Plusieurs inhibiteurs irréversibles découlèrent de ce travail. Parmi eux, le composé UCSF 84 (47)⁴⁰⁸ ou encore un dérivé FMOC (48)⁴⁰⁹, dont le processus d'inactivation fit l'objet d'une étude théorique⁴¹⁰.

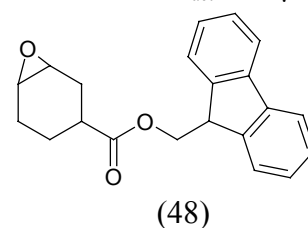
EPNP $K_{\text{inact}} = 9.9 \text{ mM}$



UCSF 84 $K_{\text{inact}} = 521 \text{ }\mu\text{M}$



dérivé FMOC $K_{\text{inact}} = 65 \text{ }\mu\text{M}$



...visant l'interface de dimérisation

La nature homodimérique de la protéase en fait une cible de choix pour une stratégie d'inhibition originale : l'inactivation de l'enzyme par dissociation des deux sous-unités du dimère. En effet, cette dissociation entraîne la disparition du site actif et donc la perte de toute activité biologique. Nous avons vu que la cohésion du dimère pouvait être majoritairement attribuée au feuillet β formé par les extrémités N et C terminales de l'enzyme¹¹⁵ (Figure 2.11.). On peut donc envisager qu'en interférant dans le processus de formation de ce feuillet β , on empêchera la dimérisation de la protéase ce qui provoquera son inactivation. Cette approche présente théoriquement plusieurs avantages : non seulement on bloque l'action de la protéase à la source, avant même son autolibération des polyprotéines gag-pol, mais on évite également une apparition rapide de mutations résistantes à l'inhibiteur. En effet, les résidus localisés au niveau de l'interface de dimérisation sont bien conservés, quelle que soit la souche virale étudiée⁹⁰. On aurait donc ici une alternative pour traiter les patients multi-résistants⁴¹¹.

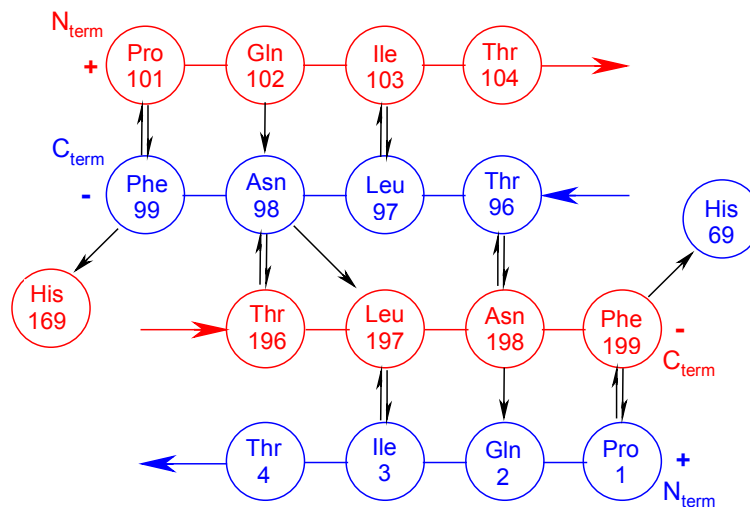


Figure 2.11. Interface de dimérisation, formée par le feuillet β associant les extrémités C et N terminales des deux sous-unités représentées en rouge et en bleu. Ce feuillet β est stabilisé par tout un réseau de ponts hydrogène (flèches noires), ainsi que par deux ponts salins existants entre les résidus terminaux. Deux ponts hydrogène supplémentaires relient les phénylalanines 99/199 aux histidines 69/169 de l'autre sous-unité.

Lors de la conception d'inhibiteurs de la dimérisation, l'approche peptidique est de prime abord évidente. Il suffit, en effet, de mettre au point des peptides qui interfèrent avec la dimérisation en se liant à une des sous-unités de la protéase, entrant ainsi en compétition avec l'autre monomère (Figure 2.12). Nous verrons dans les

paragraphe suivants qu'il existe des inhibiteurs analogues d'une seule séquence peptidique, C ou N terminale, ou comprenant deux séquences peptidiques afin de mimer plus complètement la formation du feuillet β constituant l'interface du dimère. L'approche non peptidique est, quant à elle, restée plus marginale. Enfin, nous discuterons brièvement de l'inhibition de la protéase par la formation d'hétérodimère, l'inhibiteur pouvant, dans ce cas, être considéré comme une sous-unité protéique entière.

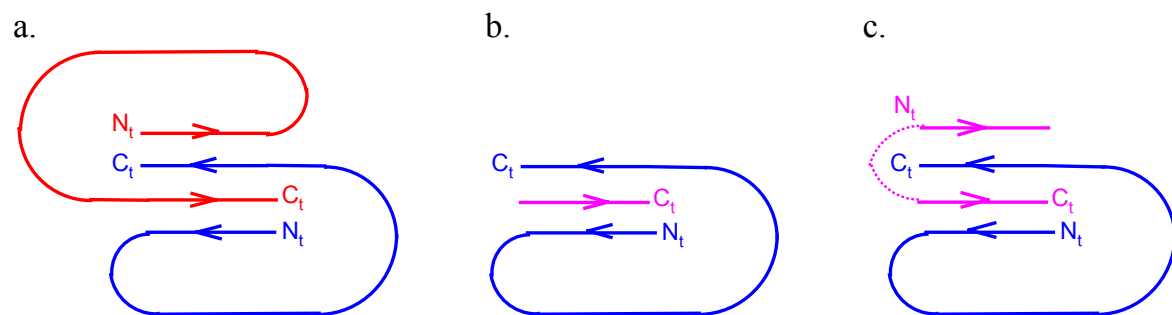


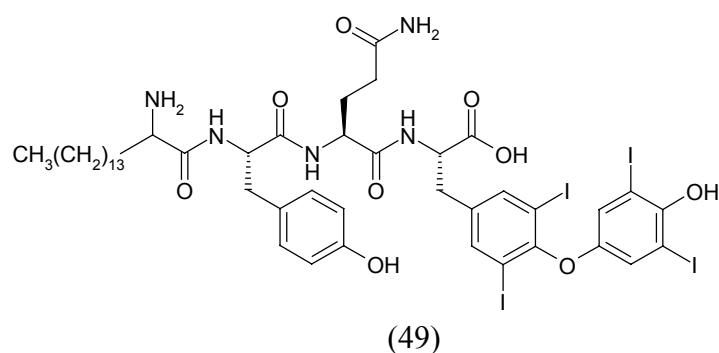
Figure 2.12. Approche peptidique lors de la conception d'un inhibiteur de la dimérisation. a. Représentation schématique de l'interface de dimérisation de la protéase. b. Peptide simple interagissant avec un seul monomère. c. Double peptide mimant la structure en feuillet β de l'interface.

I. Approche peptidomimétique

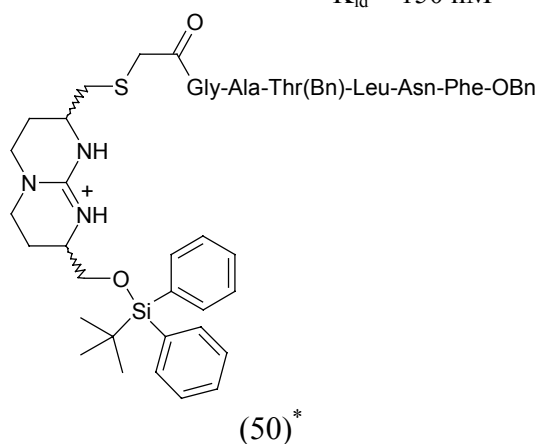
a. **Peptides simples**

Les peptides de diverses longueurs reprenant les séquences terminales de la protéase ont été systématiquement testés⁴¹²⁻⁴¹⁶. A ce stade, une séquence C terminale dont la longueur reproduit celle du feuillet β donne la meilleure activité anti-dimérisation⁴¹⁴. En vue d'augmenter l'efficacité de cette nouvelle famille d'inhibiteurs, un processus d'optimisation de ces peptides a été entrepris, notamment à l'aide de données issues d'études cristallographiques, de mutagenèse, et de modélisation moléculaire⁴¹⁷⁻⁴²². Les lipopeptides qui en découlent, comme par exemple le peptide (49), sont puissants, avec des constantes d'inhibition (K_{id}) de l'ordre du nanomolaire. Ils pourraient être considérés, à côté des inhibiteurs compétitifs de la protéase et des inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse, comme constituant une nouvelle classe d'agents antiviraux^{423,424}.

2-aminopalmitoyl-Tyr-Glu-Tyroxine-OH

 $K_{id} = 5 \text{ nM}$ 

Une équipe franco-espagnole a récemment proposé une approche originale : un guanidinium bicyclique chargé positivement sert de lien entre le peptide mimant la séquence C-terminale de la protéase et un groupement hydrophobe, comme en témoigne le composé (50). Alors que le peptide vient s'insérer entre les extrémités C et N terminales du monomère, le motif guanidinium rigide préorganise l'inhibiteur et interagit électrostatiquement avec le carboxylate de la phénylalanine 99. Le groupement hydrophobe, quant à lui, forme des contacts supplémentaires avec l'interface de dimérisation⁴²⁵.

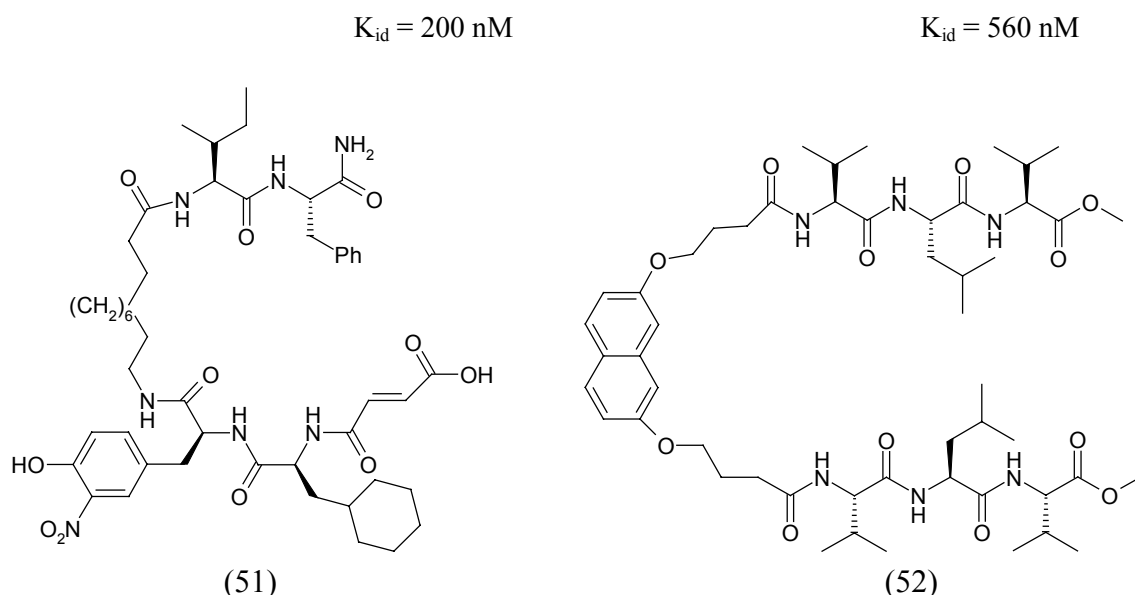
 $K_{id} = 150 \text{ nM}$ 

b. Peptides doubles

Comme les peptides correspondant aux extrémités C et N terminales sont chacun de faibles inhibiteurs de la dimérisation de la protéase, certaines équipes de recherche proposèrent de combiner les deux motifs pour en augmenter l'activité globale. Différentes manières de connecter les deux peptides furent testées : par exemple, en utilisant des liens flexibles constitués d'acides aminés^{415,426} comme le

* Stéréochimie SS ou RR ; Bn = benzyle

composé peptidique Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-(Gly)₃-Cys-Thr-Leu-Asn-Phe possédant un IC₅₀ de 40 µM. Cependant, il est peu probable que ce genre de composé interagisse avec la protéase à la manière d'une pince, comme illustré à la figure 2.12.c. On pense plutôt qu'une seule moitié du peptide est responsable de l'inhibition (Figure 2.12.b.).



Pour reproduire la structure du feuillet β constituant l'interface, il est préférable d'introduire une liaison croisée entre les extrémités N terminales des deux peptides^{421, 427-432}. Ainsi, l'optimisation des différents acides aminés des deux peptides et de la chaîne carbonée les reliant a conduit au composé (51)⁴³³. Un lien rigide permettant de fixer la conformation de la 'pince' semble, par ailleurs, favorable d'un point de vue entropique^{429,434-436}, comme en témoigne le composé (52).

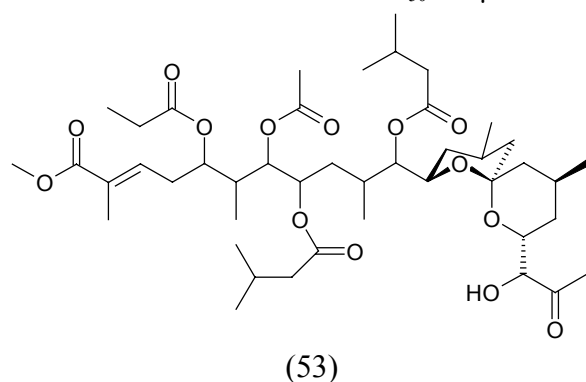
II Approche non peptidique

Le criblage d'une banque de produits naturels a permis l'identification d'un didemnacétal (53) possédant une activité antienzymatique modérée. Les études de cinétique ont montré une inhibition de la protéase réversible et non compétitive, ce qui plaiderait en faveur d'un inhibiteur de la dimérisation⁴³⁷.

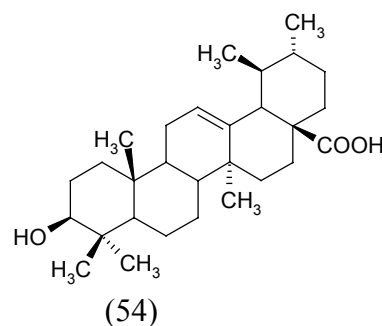
Une approche plus rationnelle a été entreprise sur base des premiers résultats obtenus avec les peptides interfaciaux. Une séquence consensus reprenant les caractéristiques des inhibiteurs basés sur l'extrémité C terminale de la protéase⁴¹⁸ a été traduite en éléments de pharmacophore. Un criblage virtuel de la banque de données structurales de Cambridge (CSD) sur base de la géométrie du pharmacophore a permis

de pointer plusieurs triterpènes, comme l'acide ursolique (54) possédant une activité antidimérisation de l'ordre du micromolaire. Il serait intéressant de développer cette famille d'inhibiteurs pour plusieurs raisons : les stéroïdes ont en général une bonne biodisponibilité et certains d'entre eux sont utilisés comme médicaments ; ces molécules polycycliques sont rigides et peuvent donc être favorables d'un point de vue entropique ; les triterpènes offrent de nombreuses possibilités de substitutions, ce qui faciliterait leur optimisation^{438,439}.

didemnacétal A

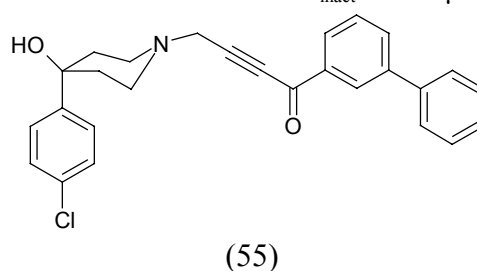
 $IC_{50} = 2 \mu M$ 

acide ursolique

 $K_i = 3.4 \mu M$ 

Quelques inhibiteurs irréversibles ont été proposés. Ainsi, les doubles peptides en pince ont servi de point de départ à une nouvelle famille d'inhibiteurs formant un pont disulfure avec la cystéine 95⁴⁴⁰. Cette cystéine peut en effet servir de cible à l'attaque d'un composé irréversible car on n'observe pas de mutation de ce résidu parmi les différents isolats de la protéase. La conception d'inhibiteurs irréversibles dérivés de l'halopéridol et ciblant initialement les acides aspartiques catalytiques a conduit à la découverte d'autres composés alkylant la cystéine 95, comme UCSF 142 (55)^{408,409,441}. L'alkylation de la cystéine 95 a par ailleurs été observée pour divers réactifs comme le DTNB, le glutathione⁴⁴², le N-éthylmaléimide et l'iodoacétamide¹⁰³.

UCSF 142

 $K_{inact} = 10.7 \mu M$ 

Enfin, la formation d'un hétérodimère peut entraîner la perte de l'activité biologique de la protéase. On utilise à cette fin des monomères modifiés par mutagenèse dirigée, monomères inactivés (par exemple en mutant l'aspartate catalytique) mais possédant une meilleure affinité pour la sous-unité naturelle. L'expression de ces monomères défectueux conduit à une activité antienzymatique et antivirale, ce qui montre la potentialité de leur utilisation dans une thérapie génique contre le virus^{411,443-446}.

...perturbant la structuration de l'enzyme

Actuellement, on étudie l'inhibition de la protéase du VIH-1 selon deux aspects principaux : soit les inhibiteurs entrent en compétition avec le substrat au niveau du site actif, soit ils empêchent la dimérisation de l'enzyme en allant se fixer au niveau de l'interface. Il existe néanmoins d'autres approches, certes plus marginales, mais importantes à mentionner dans le contexte de cette thèse. Nous parlerons ainsi tout d'abord d'un site de liaison métallique situé en surface de l'enzyme, puis plus brièvement d'inhibiteurs agissant au niveau des flaps.

a. Site de liaison métallique

La liaison de certains ions métalliques peut mener à l'inactivation d'un enzyme, soit *via* un processus d'oxydation catalysé par le métal⁴⁴⁷, soit en perturbant la structure du site actif, empêchant ainsi la liaison du substrat. Dans cette optique, un criblage d'une série d'ions métalliques a été effectué. Plusieurs cations durs* inhibent modérément la protéase (IC_{50} de l'ordre du micromolaire) comme UO_2^{2+} , Ti^{4+} , V^{5+} , Au^{3+} , Pb^{2+} ⁴⁴⁸ ou Zn^{2+} ⁴⁴⁹. L'activité inhibitrice de ces espèces peut être attribuée à leur liaison au niveau des acides aspartiques catalytiques. Par contre, les ions Cu^{2+} et Hg^{2+} ont une bonne affinité pour les résidus soufrés. Ils tendent donc à se lier aux cystéines. Chaque monomère de la protéase présente deux cystéines : la cystéine 95 enfouie dans l'interface de dimérisation et la cystéine 67 localisée en surface de l'enzyme¹¹¹. L'importance de ces résidus dans l'inhibition de la protéase par les ions cuivriques et mercuriques a été soulignée par des données de mutagenèse. En effet, une protéase dont les cystéines ont été mutées en acide α -aminobutyrique possède la même

* La théorie de Pearson distingue les cations métalliques durs des cations métalliques mous. Alors que les ions durs sont petits, de charge élevée et se lient préférentiellement aux ligands peu polarisables, les ions mous sont plus volumineux, faiblement chargés, et ont une affinité marquée pour les ligands polarisables.

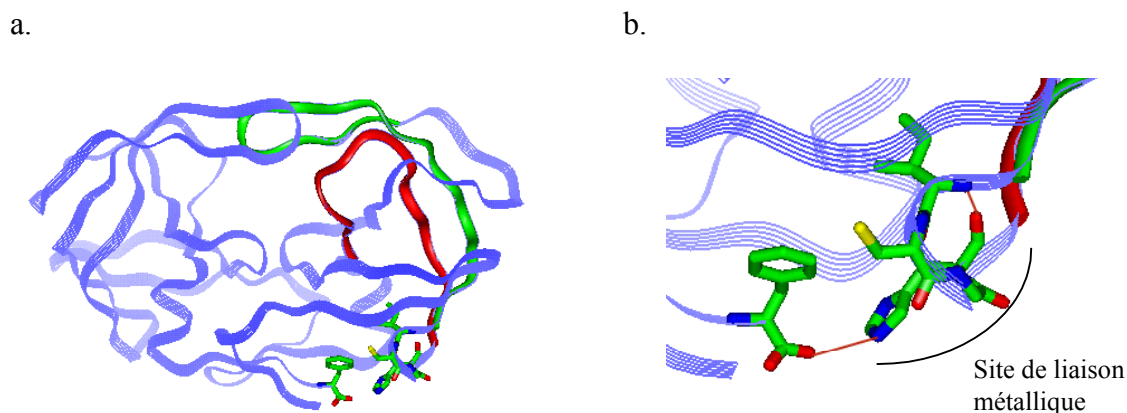
structure tridimensionnelle et la même activité protéolytique qu'une protéase sauvage, mais n'est pas inhibée par ces cations métalliques⁴⁵⁰. Par contre, lorsque l'on ajoute un ligand exogène comme le dithiothréitol⁴⁵⁰ ou l'acide ascorbique⁴⁵¹, on retrouve une inhibition ; cependant, cette activité antienzymatique est attribuée au complexe métallique formé qui se loge dans le site actif de la protéase à la manière des inhibiteurs compétitifs.

Pour expliquer le mécanisme d'inhibition des ions cuivriques et mercuriques, deux pistes sont envisagées. La première tient compte du fait que les cystéines sont rapidement oxydées en présence d'agents oxydants tels que les ions cuivriques ou mercuriques. Elles forment des ponts disulfures, menant à des agrégats de protéases inactives⁴⁵¹. Cette observation a par ailleurs incité les chercheurs à explorer la réactivité des cystéines avec le DTNB [acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)], ou le glutathion. En effet, ce composé sulfhydryle réagit avec la forme ionisée des cystéines. En mutant individuellement les deux cystéines de la protéase en acide α -aminobutyrique, il apparaît que la réaction de la cystéine 95 avec le glutathion provoque une inhibition de l'enzyme en interférant avec sa dimérisation. Par contre, l'attaque de la cystéine 67 par le glutathion stabilise ou même augmente l'activité de la protéase. Ce processus pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité protéolytique *in vivo*^{442,451-453}.

La seconde piste consiste à considérer l'inhibition de la protéase par les ions cuivriques comme un processus dynamique par lequel la liaison du cuivre à la cystéine 67 provoquerait une déformation de la structure de l'enzyme, déformation allostérique qui se répercuterait jusqu'aux flaps, interférant ainsi avec la liaison du substrat dans le site actif. Plusieurs arguments étayaient cette hypothèse. Une étude structurale en RMN a montré que les mouvements des flaps se faisaient en coordination avec ceux des résidus 59-75, à la manière d'un levier. Ainsi, quand les flaps se replient sur le site actif, le levier composé des résidus précités se lève¹²⁶ (Figure 2.13.).

Par ailleurs, une étude portant sur deux protéases mutantes, Cys67Ser et His69Ala, a confirmé non seulement l'implication de la cystéine lors de la liaison de l'ion cuivrique mais a montré également l'importance de l'histidine 69 en tant que second ligand du cuivre⁴⁵⁴. Enfin, la réactivité de la cystéine 67 est renforcée par la présence toute proche du couple de résidus histidine 69/ lysine 70 qui crée un environnement électrostatique stabilisant la forme ionisée de la cystéine à pH acide⁴⁵². On peut donc considérer la séquence Cys67-Gly68-His69-Lys70 comme un site de liaison de l'ion cuivrique. Il est intéressant de noter que le tripeptide Gly-His-Lys, est un facteur de croissance connu pour former des complexes de grande affinité avec le Cu^{2+} . En plus

d'autres activités biologiques, il joue un rôle dans le transport du cuivre dans l'organisme^{455,456}.



b. Inhibiteurs agissant au niveau des flaps

Les volets mobiles de la protéase, communément appelés flaps, jouent un rôle essentiel dans le processus de liaison et d'orientation du substrat dans le site actif¹²⁵. On pourrait donc envisager d'interférer avec le mouvement naturel de ces flaps pour perturber l'interaction enzyme/substrat. Cependant, la littérature se penchant sur ce sujet est quasi inexistante. Un peptide bactérien de séquence Ala-Gly-Lys-Lys-Asp-Asp-Asp-Pro-Pro-Glu, appelé ABTI, inhibe la protéase de manière non compétitive, avec un K_i de 17.8 nM. Des études de fluorescence et de dichroïsme circulaire ont montré que ABTI se lie dans le site actif de la protéase et inactive l'enzyme en rigidifiant les flaps, ce qui bloque l'entrée du substrat et la libération des produits de protéolyse⁴⁵⁷. On peut également mentionner l'activité inhibitrice d'un anti-corps monoclonal F11.2.32 qui réagit avec la séquence comprenant les résidus 36 à 57 de l'enzyme correspondant aux flaps^{458,459}.

Au terme de ce chapitre, quelques conclusions s'imposent.

La protéase du VIH-1 est une des protéines les plus complètement caractérisées, au point que des banques de données structurales, comme HIVdb lui sont entièrement dédiées. On recense ainsi plus de 250 structures tridimensionnelles issues d'études cristallographiques, ou de RMN. Des recherches très diversifiées ont mené, entre autres, à une description détaillée de son rôle dans la pathologie du SIDA et de son mécanisme d'action. L'attention portée à cet enzyme peut s'expliquer de différentes manières. Le clivage des polyprotéines virales sous l'action protéolytique de la protéase est une étape indispensable à la maturation du VIH. Dès lors, il y a un intérêt thérapeutique évident à contrer ce processus. D'autre part, le fait même que la protéase soit très bien décrite en fait une cible de choix pour tester des approches thérapeutiques originales, aussi bien au niveau de stratégies novatrices de conception de médicaments, que de méthodes biochimiques ou encore de mise au point de logiciels informatiques dédiés à l'élaboration de nouvelles molécules pharmacologiques.

L'apparition des **inhibiteurs de la protéase** dans l'arsenal thérapeutique contre le SIDA, peut être considérée comme un progrès marquant dans la lutte contre ce fléau. Pour la première fois dans l'histoire de l'épidémie, on a donné aux malades l'espérance d'un retour à une vie normale. Partant de structures mimant les substrats naturels de l'enzyme, la recherche d'antiprotéases s'est rapidement diversifiée. Une multitude d'approches ont été entreprises, menant à toute une série de familles d'inhibiteurs très différentes les uns des autres, recensées dans de nombreux articles de revues⁴⁶⁰⁻⁴⁷³. Ainsi, on peut pointer aussi bien des composés comme les urées cycliques issues d'une conception rationnelle basée sur les éléments caractérisant la structure tridimensionnelle de l'enzyme, que des molécules irréversibles ou des inhibiteurs de dimérisation. Ce foisonnement de stratégies a permis la mise sur le marché de huit antiprotéases : le Saquinavir, le Ritonavir, l'Indinavir, le Nelfinavir, l'Amprénavir, le Fosamprénavir, le Lopinavir et l'Atazanavir. Ces molécules, très puissantes, souffrent cependant d'inconvénients importants. La résistance virale aux médicaments actuels reste un problème majeur^{90,463,474,475} qui peut rendre un traitement inefficace en quelques mois, voire quelques semaines. De plus, les molécules peptidomimétiques, de haut poids moléculaire, ont souvent une activité antivirale amoindrie par de mauvaises propriétés pharmacocinétiques, et une faible biodisponibilité⁴⁷⁶⁻⁴⁸⁰. Des effets secondaires principalement liés à la perturbation du métabolisme des graisses sont en outre toujours à craindre^{481,482}. Les nouvelles générations d'antiprotéase doivent donc, pour pouvoir passer les différents stades

d'essais cliniques, faire preuve d'un profil de résistance imparable, d'une biodisponibilité accrue ainsi que de meilleures propriétés pharmacocinétiques. Quelques molécules devraient bientôt être commercialisées, comme, par exemple, le Tipranavir.

Dans ce contexte, les principes du 'structure-based rational design' ont été appliqués au sein du laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale pour élaborer *de novo* une famille originale d'inhibiteurs de la protéase, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

3. La conception *de novo* d'une famille originale d'anti-protéases

3.1. *Le pharmacophore, première étape d'une conception rationnelle*

Depuis une vingtaine d'années, l'épidémie du SIDA, causée par le virus de l'immunodéficience humaine, a pris une ampleur exceptionnelle. Une partie non négligeable du monde scientifique s'est rapidement lancée dans la recherche des moyens de lutte contre ce virus. Parmi les différentes options, une voie s'est avérée particulièrement prometteuse : l'inhibition de la protéase du VIH-1.

Les antiprotéases disponibles sur le marché apportent un réel progrès dans le traitement de la maladie. Cependant, leur efficacité est déforcée par des problèmes de résistance virale, de biodisponibilité, de toxicité... C'est pourquoi il reste primordial de mettre au point des familles originales d'inhibiteurs non peptidiques de la protéase, permettant de pallier ces inconvénients. C'est dans cette optique qu'un travail de recherche a été entrepris au sein du laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale, en collaboration avec plusieurs laboratoires européens*.

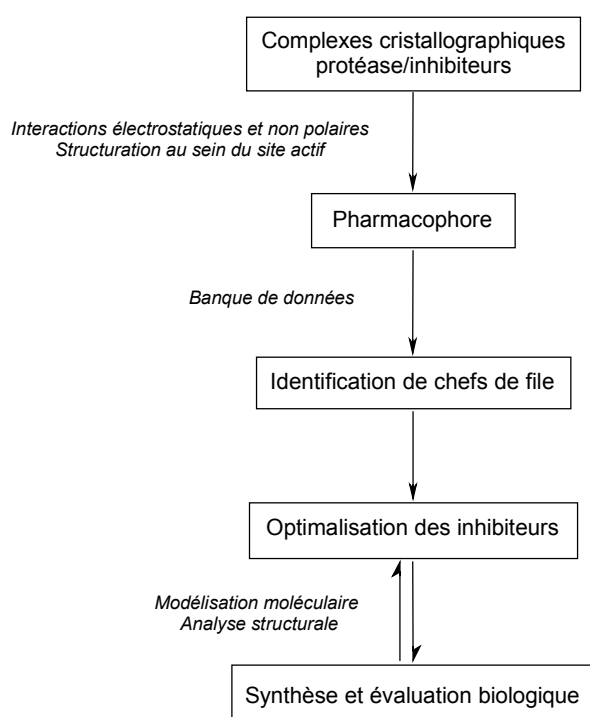


Figure 3.1. Stratégie suivie lors de la conception *de novo* d'antiprotéases.

Une stratégie de conception rationnelle a permis de découvrir *de novo* une nouvelle famille d'inhibiteurs non peptidiques visant le site actif de la protéase⁴⁸³. Cette conception *de novo* s'est inscrite au sein de la stratégie itérative reprise à la figure 3.1. Dans un premier temps, une analyse des interactions stéréoélectroniques relevées au sein de complexes cristallographiques formés par la protéase et plusieurs inhibiteurs peptidomimétiques a été effectuée. Il en résulte que tous les inhibiteurs se lient à l'enzyme dans une conformation étendue. L'interaction par ponts hydrogène

* Notamment dans le cadre du projet BIOMED2 'Rational Design, Synthesis and Evaluation of New Protease Inhibitors'.

avec les aspartates catalytiques est également une caractéristique commune. Enfin, il apparaît crucial que la molécule d'eau structurale tétracoordinée assurant par ponts hydrogène le relais entre les molécules peptidomimétiques et la protéase soit présente. Lorsque les éléments d'interaction qui semblent indispensables à une activité antienzymatique sont identifiés, on peut les regrouper au sein d'un modèle appelé pharmacophore. Dès lors, un premier pharmacophore correspondant à l'inhibition de la protéase par des composés peptidomimétiques a été établi (Figure 3.2.a.).

Pour pallier les problèmes de pharmacocinétique et de biodisponibilité, la recherche s'est orientée vers des inhibiteurs non peptidiques de la protéase, comme par exemple, les urées cycliques et leurs dérivés. Ces composés ont la particularité d'intégrer dans leur structure une fonction chimique analogue à la molécule d'eau tétracoordinée. Un second pharmacophore incorpore donc cette molécule d'eau comme élément d'interaction énergétiquement favorable, assurant plus de spécificité, sous la forme d'un accepteur de proton Y (Figure 3.2.b.).

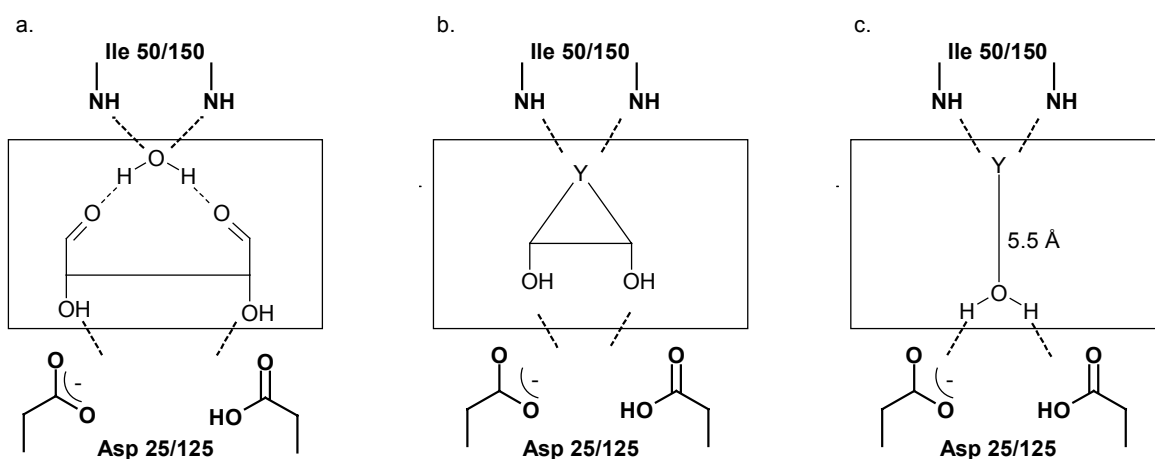


Figure 3.2. Pharmacophores proposés pour les inhibiteurs compétitifs de la protéase du VIH-1.

- a. Inhibiteurs peptidomimétiques. Une molécule d'eau tétracoordinée assure un relais entre les carbonyles des inhibiteurs peptidomimétiques et les résidus Ile50/150 des volets de la protéase. Les groupements hydroxyles interagissent avec les résidus catalytiques Asp25/125.
- b. Inhibiteurs non peptidiques. Un accepteur de proton Y remplace la molécule d'eau tétracoordinée.
- c. Inhibiteurs métallo-organiques. Le pharmacophore inclut la molécule d'eau catalytique nécessaire au mécanisme de protéolyse de la protéase, ainsi que l'accepteur de proton Y.

La plupart des inhibiteurs cocrystallisés avec la protéase du VIH-1 répondent à l'un ou l'autre de ces pharmacophores. Cependant, l'inhibiteur UCSF8, découvert suite à un criblage virtuel par une équipe de chercheurs californiens ($K_i = 15 \mu\text{M}$)⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁸, possède un mode de fixation original au sein du site actif de la protéase (Figure 3.3.). Ce dérivé de l'halopéridol interagit, en effet, avec l'enzyme, principalement au niveau des flaps, par l'intermédiaire d'un ion chlorure. Les flaps adoptent une conformation

ouverte semblable à celle observée dans les structures cristallographiques de l'enzyme non complexé. Au niveau des aspartates catalytiques, on retrouve la molécule d'eau nécessaire à l'activité protéolytique, remplacée dans le cas des complexes enzyme/inhibiteur peptidique ou peptidomimétique, par un hydroxyle isostérique. Cette molécule d'eau se trouve positionnée de façon idéale pour stabiliser les résidus catalytiques et peut être considérée comme une molécule d'eau structurale appartenant à la protéine.

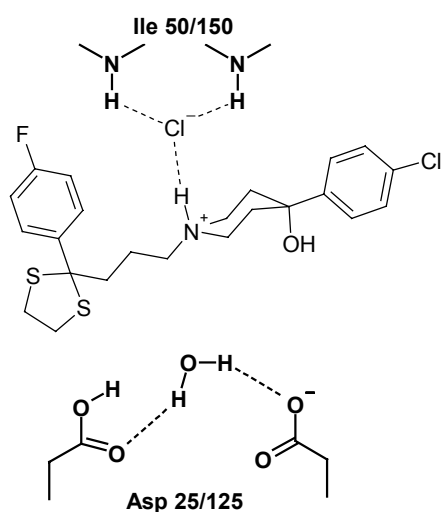


Figure 3.3. Interaction entre le composé UCSF8 et la protéase.

Cette observation a permis de proposer un pharmacophore original en incorporant la molécule d'eau catalytique à la place des fonctions hydroxyles isostériques. Une distance de 5.5 Å sépare les deux éléments pharmacophoriques. Remarquons qu'inclure la molécule d'eau catalytique au sein d'un inhibiteur potentiel de la protéase nécessite sa coordination par un métal. Le pharmacophore minimal décrit à la figure 3.2.c. s'adresse donc plus particulièrement à une classe de molécules de nature métallo-organique. Le métal joue alors le rôle d'agent structurant, permettant d'organiser les différents éléments du pharmacophore dans une géométrie adéquate pour l'interaction avec l'enzyme.

Après avoir rassemblé les éléments structuraux nécessaires pour assurer à tout composé une bonne inhibition dans un modèle tridimensionnel, on peut effectuer une recherche informatique dans une banque de données structurales. Nous verrons dans le point suivant que celle-ci a permis d'identifier une molécule chef de file, dont l'optimalisation a débouché sur une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1.

3.2 L'identification d'un complexe métallo-organique, chef de file d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1

Le pharmacophore présenté à la figure 3.2.c. constitue la base de la stratégie élaborée pour concevoir des inhibiteurs non peptidiques originaux de la protéase du VIH-1. A l'aide des critères repris dans ce pharmacophore, un criblage virtuel de la banque de données structurales de Cambridge -en anglais, Cambridge Structural Database system ou CSD- a été entrepris. CSD est une banque de données tridimensionnelles reprenant les structures cristallographiques d'environ 300 000 petites molécules.

Parmi la vingtaine de composés émergeant de cette recherche, le complexe métallique diaqua [bis-(2-pyridyl carbonyl)-amido] copper (II) nitrate⁴⁸⁹, répertorié dans CSD sous le code SETCEZ, fut sélectionné comme chef de file et testé pour son activité anti-enzymatique au sein du laboratoire du Prof. M. Reboud (Institut J. Monod, Paris). SETCEZ inhibe, en effet, faiblement la protéase du VIH-1, de manière exclusivement compétitive, avec une constante d'inhibition de $480 \pm 150 \mu\text{M}$. L'effet inhibiteur a été attribué au complexe et non au ligand seul, car on observe une perte totale d'activité lorsque les ions cuivriques sont déplacés par de l'EDTA⁴⁸³.

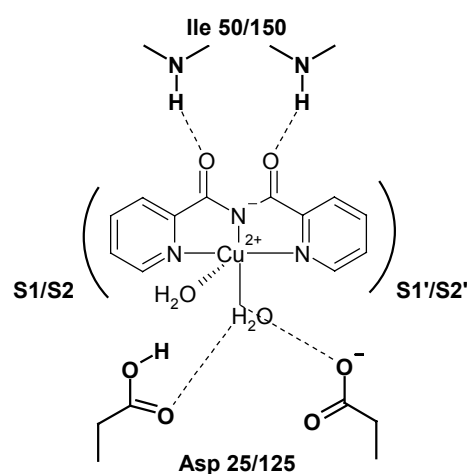


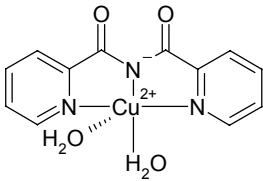
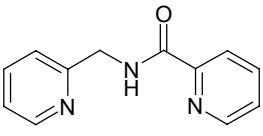
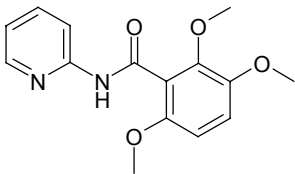
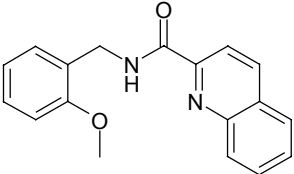
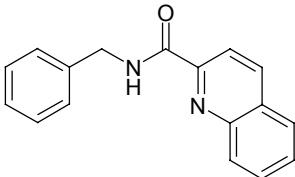
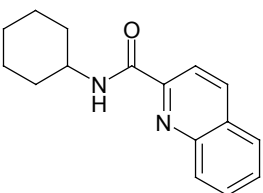
Figure 3.4. Modèle d'interaction du composé SETCEZ au sein du site actif de la protéase.

Une étude de modélisation moléculaire du complexe SETCEZ au sein du site actif a démontré la possibilité de former les interactions clés reprises dans le pharmacophore (Figure 3.4.). Elle met également en évidence la petite taille de ce complexe qui limite l'occupation des différents sous-sites, ce qui expliquerait le faible pouvoir inhibiteur observé. Différentes modifications visant à optimiser l'interaction avec ces sous-sites sont dès lors susceptibles d'améliorer l'activité antienzymatique.

Dans cette optique, plusieurs ligands dérivant de SETCEZ furent synthétisés au sein des laboratoires du Prof. O. Kahn (CNRS, Bordeaux) et du Dr S. Sicsic (CNRS, Paris). Dans un premier temps, on décida, pour des raisons d'accessibilité synthétique, de considérer des composés possédant une seule fonction carbonyle, suffisante pour interagir avec les résidus Ile50/150 des flaps (Tableau 3.1., ligand **L0**). On proposa ensuite des ligands un peu plus volumineux, permettant une meilleure interaction avec les sous-sites enzymatiques (Tableau 3.1., ligands **L1** à **L4**).

La synthèse des ligands fut suivie par leur complexation avec les ions cuivriques par l'ajout de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, pour former les complexes **C1** à **C4**. Notons que dans le cas du ligand **L0**, deux sels d'ions cuivriques furent utilisés, le $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ et le $\text{Cu}(\text{PF}_6)_2$, donnant respectivement les complexes **C01** et **C02**.

Tableau 3.1. Structure des ligands synthétisés lors du processus d'optimisation du chef de file, SETCEZ. L'activité des complexes formés par ces ligands et l'ion cuivrique est également reprise.

Ligand (ou complexe)	Activité du complexe	Ligand	Activité du complexe
SETCEZ 	$K_i = 480 \pm 150 \mu\text{M}$	L0 	C01, C02 inactifs
L1 	C1 $\text{IC}_{50} = 1.5 \mu\text{M}$	L2 	C2 $\text{IC}_{50} = 1.0 \mu\text{M}$
L3 	C3 $\text{IC}_{50} = 2.0 \mu\text{M}$	L4 	C4 instabilité dans le tampon cinétique

Les tests enzymatiques donnèrent des résultats variés difficilement interprétables *a priori* (Tableau 3.1.). En effet, les complexes **C01** et **C02**, construits à partir d'un ligand très proche de celui de SETCEZ, ne présentent aucune activité inhibitrice, dans les limites de leur solubilité (1.10^{-4} M). Par contre, les complexes **C1**, **C2** et **C3** ont des IC_{50} de l'ordre du micromolaire, ce qui équivaut à une activité antienzymatique environ 500 fois plus élevée que celle du chef de file SETCEZ. Ce résultat positif est lui-même assez étonnant : comment des ligands pourtant semblables à celui de SETCEZ peuvent-ils être à l'origine d'un tel gain d'activité? Enfin, le pouvoir inhibiteur du complexe **C4** n'a pu être déterminé car il présente une instabilité dans les tampons utilisés lors des tests enzymatiques. Ces données laissèrent supposer

que les complexes **C01**, **C02**, **C1**, **C2**, **C3** et **C4** adoptaient un mode de complexation différent de celui du chef de file SETCEZ. Dès lors, une analyse structurale s'imposait pour pouvoir interpréter les résultats des tests enzymatiques et poser des relations entre la structure et l'activité de ces composés.

En conclusion, on peut dire qu'une stratégie de conception *de novo* d'inhibiteurs non peptidiques de la protéase du VIH-1 a été suivie avec succès au laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale. La méthodologie appliquée se rapproche du 'rational drug design', développé au chapitre précédent, qui a débouché sur la mise au point de composés prometteurs dans la lutte contre le SIDA, tels que le Tipranavir ou les urées cycliques. Ainsi, l'analyse des interactions observées dans les complexes cristallographiques formés par la protéase et des inhibiteurs peptidomimétiques ou non peptidiques a permis d'élaborer un pharmacophore reprenant les caractéristiques stéréoélectroniques nécessaires à une inhibition efficace de l'enzyme. Sur base de ce pharmacophore, un criblage informatique dans la banque de données structurales de Cambridge a été effectué. A l'issue de cette recherche, on épingla un complexe au cuivre II, appelé SETCEZ, possédant une constante d'inhibition d'environ 480 micromolaires. Cet inhibiteur compétitif fut désigné comme chef de file d'une famille originale d'anti-protéases de nature métallo-organique. Son optimisation conduisit à la production d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 possédant une meilleure activité antienzymatique. Cependant, l'amélioration du pouvoir inhibiteur de ces complexes prometteurs nécessite la compréhension des mécanismes régissant le type de complexation obtenu autour de l'ion cuivrique, la stabilité relative de ces complexes et la relation précise existant entre la structure de ces inhibiteurs et l'affinité observée.

Au cours de cette thèse, nous développerons la caractérisation structurale de ces composés au moyen de différentes études physico-chimiques et théoriques. Elle nous permettra de poser les critères nécessaires à une inhibition compétitive de la protéase du VIH-1 par des complexes métallo-organiques. Ces critères serviront ensuite à proposer une nouvelle génération d'inhibiteurs métallo-organiques optimisés.

Les complexes métallo-organiques au cuivre que nous allons étudier font partie d'une branche de la chimie en pleine expansion : la chimie bio-inorganique, qui au-delà de la chimie organique classique s'intéresse à tous les éléments du tableau périodique et en particulier aux métaux et à leur complexation. Dès lors, il nous a semblé important de dédier un chapitre à cette discipline passionnante.

4. La chimie bio-inorganique au service de la médecine

4.1. La chimie bio-inorganique, une discipline en pleine expansion

... étudiant l'influence des métaux dans les processus biologiques

La chimie bio-inorganique est une discipline assez jeune mais qui connaît actuellement un essor particulier. En effet, cela ne fait qu'une cinquantaine d'années que l'on applique systématiquement les principes de chimie inorganique pour élucider le rôle que jouent les métaux dans les systèmes biologiques⁴⁹⁰; Cette évolution rapide découle, entre autres, du développement de méthodes spectroscopiques puissantes permettant d'appréhender la structure, le comportement dynamique et la réactivité des biomolécules, qu'elles soient ou non en interaction avec des métaux⁴⁹¹⁻⁴⁹³. Le rôle primordial que jouent les espèces métalliques dans les processus biologiques est maintenant clairement établi^{491,494}.

A titre d'exemple, on peut citer le fer qui, sous ses formes ionisées Fe^{2+} ou Fe^{3+} , est intimement impliqué dans les mécanismes biologiques des enzymes catalysant les réactions avec l'oxygène, que ce soit par l'intermédiaire d'une liaison à un groupement porphyrine/hème (comme dans l'hémoglobine ou le cytochrome P450), ou non^{447,495,496}. Le zinc présent dans l'organisme sous forme d'ions Zn^{2+} est stable par rapport aux réactions d'oxydo-réduction. Il est cependant indispensable à la structuration de nombreux enzymes, en formant, par exemple, des motifs comme des 'doigts de zinc' qui régulent la transcription des gènes dans les noyaux des cellules⁴⁹⁷. Le zinc est par ailleurs un composant de l'insuline indispensable à la régulation du métabolisme du sucre. Les ions K^+ , Na^+ , et Ca^{2+} jouent également des rôles importants dans les processus physiologiques, notamment au niveau de la transmission du signal neuronal⁴⁹⁸. Des métaux aussi divers que le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse, le cobalt, le nickel, le molybdène ou le vanadium font partie intégrante de nombreux enzymes, appelés métalloprotéines, qui catalysent une multitude de réactions chimiques indispensables à la vie⁴⁹¹.

Si le rôle joué par les métaux dans les processus biologiques focalise l'attention de nombreux chimistes bio-inorganiciens, une partie non négligeable d'entre eux étudient les voies par lesquelles ces métaux sont transportés dans l'organisme, distribués sur leur site d'action et éliminés, ainsi que les mécanismes liés à leur toxicité^{499,500}. Avec l'aboutissement du séquençage du génome humain et d'autres espèces vivantes, de nouveaux champs d'investigation se sont ouverts à la chimie bio-

inorganique. Il s'agit dorénavant d'identifier directement les relations qui unissent les métaux aux informations contenues dans les gènes. Cela nécessitera de développer de nouvelles expertises dans des domaines tels que la bio-informatique ou la génétique, et poussera en avant l'exploitation des techniques analytiques et des méthodes spectroscopiques traditionnelles⁵⁰¹.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié plusieurs complexes au cuivre, inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Il nous a donc paru important de développer plus avant les connaissances que l'on a de ce métal. Le paragraphe suivant est donc consacré aux rôles assurés par le cuivre en milieu physiologique, à son transport et à sa toxicité.

... pointant le cuivre comme élément essentiel à la vie

Avec le fer et le zinc, le cuivre est un des principaux éléments métalliques indispensables à tout organisme vivant. En solution, il peut adopter deux étages d'oxydation différents et se trouver ainsi sous la forme Cu^+ ou Cu^{2+} . Cette propriété fait de lui un cofacteur clé dans de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydoréduction, engendrant soit un processus de transfert électronique, soit la liaison, l'activation et la réduction de l'oxygène moléculaire, de l'ion superoxyde, des nitrites ou du monoxyde d'azote^{502,503}.

A titre d'exemple, quelques protéines au cuivre peuvent être citées^{503,504}. Le cytochrome-c oxydase est un complexe protéinique ancré dans la membrane interne des mitochondries⁵⁰⁵. Il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau et utilise l'énergie produite par cette réaction pour créer un gradient de protons à travers la membrane dans le processus de respiration. La céruloplasmine peut lier au moins six ions de cuivre. Elle est impliquée dans les mécanismes de transport du fer. La superoxyde dismutase est, quant à elle, localisée dans le cytoplasme où elle catalyse la dismutation des anions superoxyde. Le cuivre est indispensable à cette activité: durant la réaction catalytique, le cuivre (II) est tout d'abord réduit par l'anion superoxyde O_2^- pour donner de l' O_2 et il est ensuite réoxydé lors de la production de l' H_2O_2 . Aucun autre métal ne peut assurer cette fonction.

Cette liste est loin d'être exhaustive : on retrouve le cuivre dans des processus biologiques aussi divers que la respiration, le transport du fer, la protection face au stress oxydatif, la production hormonale, la pigmentation, la coagulation du sang, la croissance cellulaire et le développement.

Cependant, ce métal est également impliqué dans des réactions d'oxydoréduction générant le radical hydroxyl, qui cause des dommages irréversibles aux protéines, aux lipides et à l'ADN. Cette toxicité intrinsèque force les êtres vivants à adopter des stratégies visant à limiter la concentration de cuivre libre dans l'organisme. C'est ainsi que le cuivre est pris en charge par différentes protéines assurant son transport en milieu physiologique.

Depuis quelques années des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes régissant l'acheminement du cuivre vers les différentes métalloprotéines intracellulaires⁵⁰⁶⁻⁵¹³. Dans le plasma, le cuivre se trouve sous forme d'ion Cu^{2+} . Avant son entrée dans la cellule, il est réduit en Cu^+ par des métallo-réductases⁵¹⁴. Il traverse la membrane plasmatique *via* un récepteur Ctr. Contrairement à ce que l'on pensait il y a encore peu de temps, la quantité de cuivre libre présente dans le cytosol est très faible. Pour éviter des dommages oxydatifs, sa concentration est, en effet, maintenue en dessous de 10^{-18} M par des systèmes de récupération des métaux comme les métallothionines (MT). Il est donc indispensable que les ions cuivreux soient pris en charge par des transporteurs spécifiques, des protéines chaperons, qui les conduiront jusqu'à leur site d'action. On connaît actuellement trois voies distinctes utilisées lors du transport intracellulaire du cuivre (Figure 4.1.). Elles permettent respectivement d'acheminer le Cu^+ I. vers le cytochrome C oxydase (CytOx) dans les mitochondries, II. vers la Zn,Cu superoxyde dismutase (SOD1), et III. vers le système de sécrétion de l'appareil de Golgi.

La première voie implique notamment la protéine chaperon Cox17 et la protéine mitochondriale Sco⁵¹⁵. Cox17 lie trois ions cuivreux *via* des résidus cystéine

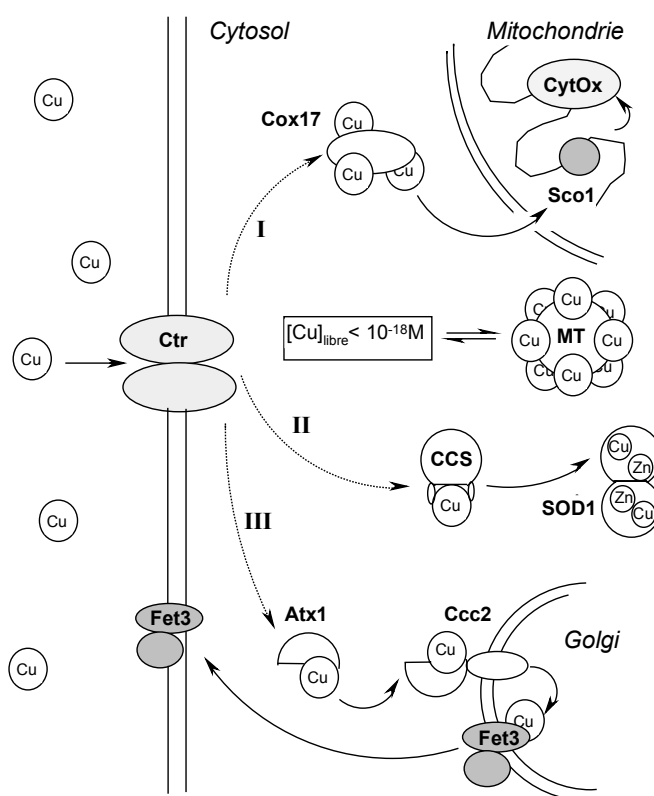


Figure 4.1. Transport intracellulaire du cuivre. Trois voies spécifiques sont connues : elles permettent acheminer le cuivre vers : I. le cytochrome C oxydase, II. la superoxyde dismutase, III. le système de sécrétion. La nomenclature utilisée ici provient de l'étude du transport du cuivre chez la levure.

puis traverse les pores des mitochondries pour céder le cuivre à la protéine Sco qui à son tour le transfère au cytochrome C oxydase.

La voie II permet de délivrer le cuivre à la superoxyde dismutase par l'intermédiaire de la protéine chaperon CCS⁵¹⁶. Cette dernière possède, en plus d'un site de liaison du cuivre constitué d'une méthionine et de deux cystéines, un domaine homologue à une sous-unité de la SOD. Les deux protéines peuvent, dès lors, s'associer pour échanger l'ion cuivreux.

Enfin, la voie III permet de diriger le cuivre dans le système de sécrétion vers l'environnement extracellulaire en passant par l'appareil de Golgi. Le transport du Cu^+ se fait alors à l'aide de protéines spécifiques comme, notamment, Atx1, Ccc2 et Fet3 chez la levure qui correspondent respectivement aux protéines humaines Atox, ATP7A/B et céruloplasmine. C'est tout d'abord la protéine chaperon Atox qui prend en charge l'ion cuivreux. Elle le cède ensuite à la protéine ATP7A/B ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi. A l'intérieur de l'appareil de Golgi, le cuivre se lie à la céruloplasmine impliquée dans le métabolisme du fer. Le complexe céruloplasmine/ Cu^+ est alors transféré vers la membrane plasmique à l'intérieur des vésicules golgiennes. L'absence du gène codant pour les protéines ATP7A ou 7B provoque, chez l'homme, les deux maladies liées à un mauvais métabolisme du cuivre: le syndrome de Menkes et la maladie de Wilson.

Le mécanisme d'échange du cuivre entre Atx1 et Ccc2 est intéressant car il illustre bien les propriétés particulières des métaux et les conséquences que cela peut avoir au niveau biologique⁵¹². En effet, le cuivre(I) se lie à la protéine Atx1 via deux cystéines. Ce type de coordination a deux conséquences notables. D'une part, la liaison entre un soufre 'mou' et l'ion cuivreux polarisable est thermodynamiquement très stable, ce qui permet la formation d'un complexe Atx1/ Cu^+ à haute affinité. D'autre part, un complexe cuivreux à deux ligands peut facilement en accommoder un troisième, ce qui facilite le transfert du cuivre vers la protéine Ccc2, suivant le mécanisme décrit à la figure 4.2. Ce processus a récemment été appuyé par des études de RMN couplées à de la modélisation moléculaire⁵¹⁷.

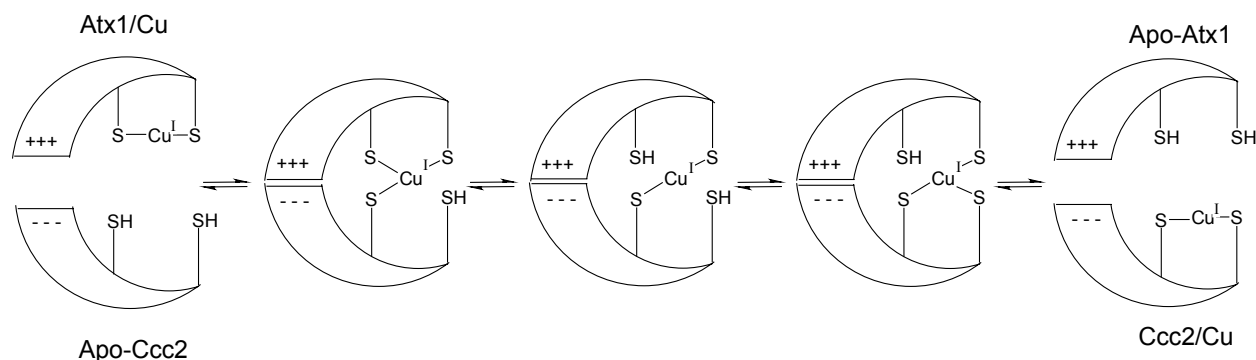


Figure 4.2. Mécanisme d'échange de l'ion cuivreux entre les protéines Atx1 et Ccc2. La reconnaissance entre les protéines est facilitée par la présence sur Ccc2 d'un domaine homologue à Atx1. L'échange du cuivre se produit progressivement lors de la juxtaposition des sites de liaison métalliques, par l'intermédiaire d'une troisième coordination.

Les processus régulant l'apport du cuivre à ses différentes cibles physiologiques sont, nous le voyons, extrêmement élaborés et complexes. Grâce à eux, un individu sain risque très peu de souffrir de pathologies dues à un déficit ou à un excès de cuivre dans l'organisme. Quelques maladies liées au métabolisme du cuivre peuvent néanmoins être citées⁵¹⁸. La maladie de Wilson et le syndrome de Menkes sont tous deux des maladies génétiques causées par des mutations affectant les gènes codant pour les protéines transporteuses ATP7A ou B⁵¹⁹. Le syndrome de Menkes provoque un déficit en cuivre qui se traduit notamment par des problèmes de développement et des lésions cérébrales. Au contraire, dans le cas de la maladie de Wilson, l'excrétion du cuivre excédentaire ne peut se faire correctement. Il s'accumule donc progressivement dans les cellules, causant des lésions principalement au niveau du foie et du cerveau. Certaines maladies cérébrales sont aggravées par la présence de cuivre^{498,520,521}. Ainsi, la précipitation de la protéine amyloïde β induisant la formation de plaques amyloïdes typiques de la maladie d'Alzheimer serait favorisée par le cuivre⁵²²⁻⁵²⁵. Il pourrait également être impliqué dans le processus de réorganisation conformationnel du prion qui cause chez l'homme la maladie de Creutzfeldt-Jakob⁵²⁶⁻⁵³¹. Enfin, certaines mutations du gène codant pour la Cu,Zn superoxyde dismutase entraînent la sclérose amyotrophique latérale^{505,532}. On postule, à l'heure actuelle, que la protéine mutante adopte une autre conformation lors de sa liaison au cuivre, ce qui génère des espèces oxydantes nocives.

4.2. *L'utilisation des métaux en médecine, une approche originale et fructueuse*

... allant du traitement du cancer aux agents de contraste

Si près de 30 éléments atomiques sont essentiels à la survie des mammifères à sang chaud, on peut exploiter quasiment tout le tableau périodique pour concevoir de nouveaux composés thérapeutiques ou agents de diagnostic⁵³³ (Figure 4.3.). Cela élargit le champ d'action de la chimie médicinale traditionnelle qui se limitait jusqu'il y a peu à quelques éléments comme l'hydrogène, le carbone, l'azote, l'oxygène, le phosphore, le soufre et les halogènes⁵³⁴.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac**															
		*	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
		**	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	

Figure 4.3. Tableau périodique reprenant les éléments essentiels à la survie des mammifères (en rouge). Parmi les métaux, de nombreux autres éléments (en bleu) ont débouché sur des applications thérapeutiques.

L'utilisation des métaux en médecine ouvre donc de nouveaux horizons mais nécessite de prendre en compte leur complexité propre. Ainsi, lorsque l'on conçoit des complexes métalliques à visée thérapeutique, différents événements doivent entrer en considération⁵³⁵. L'hydrolyse des complexes métalliques en milieu biologique peut s'avérer problématique. Si on souhaite qu'un complexe actif atteigne sa cible, il doit persister sous cette forme, aussi bien dans un milieu aqueux que dans un milieu plus hydrophobe caractéristique des membranes cellulaires, des vésicules et des sites actifs des enzymes. L'interaction des composés métalliques avec diverses protéines plasmatiques, telles que l'albumine et la transferrine qui possèdent des domaines structuraux capables de former des liaisons à haute affinité avec les métaux peut également représenter un obstacle à l'objectif thérapeutique fixé. Un autre point d'achoppement, plus classique, est le passage des membranes. En effet, le complexe

formé du métal et de ses ligands doit, dans certains cas, pour atteindre sa cible moléculaire, traverser la membrane cellulaire, intact. Enfin, avant d'arriver à sa cible moléculaire, le complexe métallique entre en compétition avec les protéines spécialisées dans le transport des métaux comme les protéines chaperons dont nous avons parlé dans le paragraphe précédent.

Ces difficultés posent autant de nouveaux défis à réaliser. Néanmoins, l'approche bio-inorganique a été fructueuse dans de nombreux domaines de la médecine. Elle remonte presque à la nuit des temps : au troisième millénaire avant l'ère chrétienne, les égyptiens utilisaient le cuivre pour stériliser l'eau ; l'or fut également exploité dans les médications chinoises et arabes il y a plus de 3500 ans tandis qu'à la même époque des remèdes à base de fer ou de zinc faisaient partie de la pharmacopée égyptienne. Pendant la Renaissance, on commença à utiliser des sels de mercure comme diurétique et on découvrit le caractère essentiel du fer dans la nutrition. Depuis une centaine d'années, la chimie inorganique a été introduite d'une manière plus rationnelle en pharmacologie : les composés arsénieux ont, au début du siècle passé, fait leurs preuves dans le traitement de la syphilis, tandis que l'on utilisait des cyanures d'or pour combattre la tuberculose ou des composés à base d'antimoine pour traiter les leishmanioses (maladies parasitaires de la peau). En 1929, des médecins français utilisaient des dérivés de l'or pour traiter l'arthrite rhumatoïde, une technique toujours largement utilisée à l'heure actuelle^{533,536}. Depuis, de nombreuses équipes s'intéressent de plus près aux potentialités des composés métallo-organiques en recherche pharmaceutique, que ce soit dans le cadre des thérapies anticancer, de la mise au point d'agents de contraste, ou d'inhibiteurs enzymatiques (Figure 4.4.).

Parmi les médicaments métallo-organiques les plus célèbres, on peut citer le cisplatine et ses dérivés de seconde génération comme le carboplatine (Figure 4.5.), utilisés très largement dans le traitement du cancer^{537,538}. Ces complexes au platine (II), possédant une géométrie de type plan carré, échangent leurs ligands non aminés par une liaison à deux guanines de l'ADN, ce qui entraîne une distorsion de ce dernier et *in fine* l'inhibition du processus de réplication et de transcription de l'ADN^{534, 535, 539-542}. Toute une série de complexes d'autres métaux ont également été proposés comme candidats anti-cancéreux. Ainsi certains complexes au rhuthénium (II) ou (III) ont des activités anti-tumorales prometteuses^{539,543}, de même que des complexes de titane (IV), d'or (I), ou des sels de gallium (III)⁵³⁴.

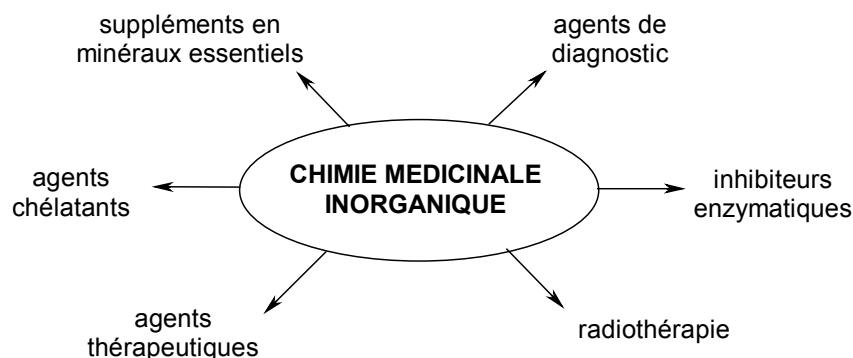


Figure 4.4. Utilisations de la chimie inorganique en médecine.

D'autres classes bien connues de médicaments métallo-organiques peuvent être relevées comme celle des complexes d'or (I) utilisés dans le traitement de l'arthrite, avec par exemple l'auranofine (Figure 4.5.)⁵⁴⁴, ou celle des sels de bismuth (III)⁵⁴⁵ qui présentent une toxicité pour la bactérie responsable des ulcères gastro-intestinaux. On peut citer, par ailleurs, le lithium⁵⁴⁶, un anti-dépresseur courant, et les composés anti-infectieux à base d'argent (I) ou d'antimoine (V).

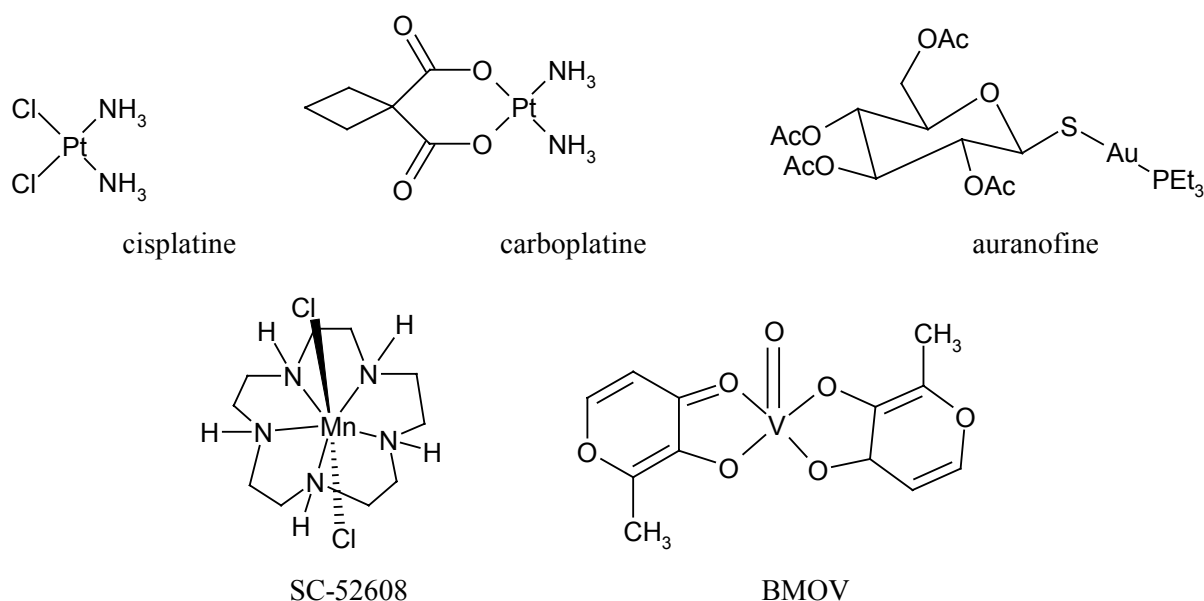


Figure 4.5. Complexes métallo-organiques utilisés dans le traitement du cancer (cisplatine, carboplatine), de l'arthrite (auranofine), des dommages oxydatifs (SC-52608) et du diabète (BMOV).

Il est également possible de mimer le comportement d'enzymes ou de peptides biologiques à l'aide de complexes métalliques. Ainsi, on peut simuler l'action de la superoxyde dismutase en utilisant des complexes macrocycliques au fer (III) et surtout au manganèse (II) et (III), comme, par exemple, le composé SC-52608 (Figure 4.5.), capteur des radicaux libres superoxyde⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹. Certains complexes au vanadium (IV) et

(V) reproduisent, quant à eux, les effets de l'insuline et sont donc précieux dans le traitement du diabète⁵⁵⁰⁻⁵⁵³.

Par ailleurs, la chimie bio-inorganique a apporté sa contribution au développement d'inhibiteurs enzymatiques⁵⁵⁴. En effet, les métaux jouent un rôle structural et/ou fonctionnel dans de nombreux enzymes. Il est possible d'inactiver un enzyme en agissant au niveau de ces métaux endogènes, par exemple en complexant le métal ciblé par un ligand actif. Cette approche est exploitée notamment dans le cadre de l'inhibition des métalloprotéases de matrice qui entrent en jeu dans les problématiques du cancer, de l'arthrite et de la sclérose multiple^{555,556}. D'autres mécanismes d'inhibition sont envisageables, comme la liaison d'un complexe métallo-organique avec certains résidus du site actif de l'enzyme ciblé qui ne peut plus, dès lors, interagir avec son substrat naturel. Par exemple, on peut citer un inhibiteur intéressant de la trypsine, le composé BABIM. Ce ligand organique a été conçu pour interagir avec l'enzyme ciblé via un atome de zinc exogène présent dans le milieu physiologique (Figure 4.6.a.). Alors que le ligand organique assure une spécificité à l'inhibiteur, la liaison métallique *via* le zinc permet un ancrage beaucoup plus fort dans le site actif de l'enzyme^{557,558}. Une autre étude portant sur l'inhibition de la trypsine et de la thermolysine utilise la même approche. Dans ce cas, la spécificité de l'inhibiteur est assurée par le ligand organisé en une géométrie plane autour d'un ion de cobalt (III), alors que les positions apicales du complexe permettent une interaction directe avec une histidine impliquée dans le mécanisme catalytique de l'enzyme^{559,560} (Figure 4.6.b.). Il est important de noter que les inhibiteurs de la protéase du VIH-1 que nous étudions dans le cadre de cette thèse découlent d'une approche semblable, comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

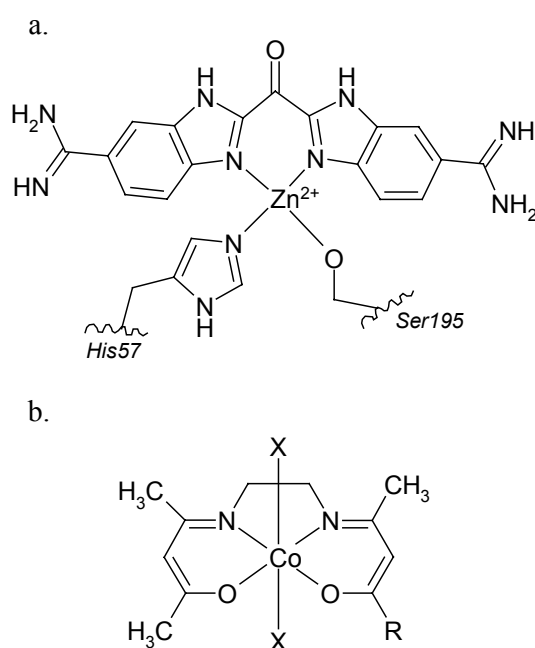


Figure 4.6. Inhibiteurs enzymatiques utilisant un métal pour relayer leur interaction avec la protéine cible.

a. Interaction du ligand BABIM avec la sérine 195 et l'histidine 57 de la trypsine via une complexation du zinc.

b. Complexe au cobalt inhibant la trypsine et la thermolysine. Un des ligands en position apicale X est échangé par l'histidine catalytique.

Enfin, les complexes métalliques sont largement utilisés en imagerie par résonance magnétique nucléaire ou en radiothérapie. Ainsi, la plupart des agents de contraste contiennent des ions métalliques tels que le gadolinium (III), le manganèse (II) ou le fer (III) caractérisés par un grand nombre d'électrons non appariés et de longs temps de relaxation. On peut citer à titre d'exemple les composés cliniques $\text{Gd}(\text{dota})^-$ permettant de détecter les anomalies localisées au niveau de la barrière hémato-encéphalique ou le $\text{Mn}(\text{dpdp})^{4-}$ pouvant mettre en évidence certains cancers du foie (Figure 4.7.)⁵³⁴.

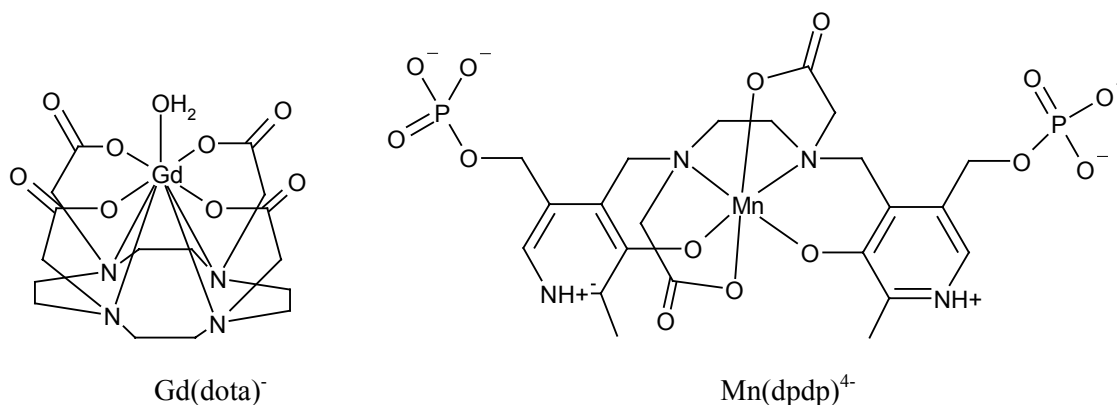


Figure 4.7. Exemple de complexes métalliques utilisés couramment comme agents de contraste en imagerie par RMN.

Les complexes d'éléments émettant des rayonnements γ comme l'isotope $^{99\text{m}}$ du technétium⁵⁶¹ (Figure 4.8.), mais aussi les isotopes radioactifs du thallium, de l'indium, du gallium, du rhuténium⁵⁴³, du cobalt, du chrome et de l'ytterbium sont également utilisés comme agents de diagnostic⁵⁶². D'autres éléments radioactifs comme le strontium, le samarium ou le rhénium, émettent des rayonnements β et sont directement utilisés en radiothérapie. On peut également mentionner les thérapies photodynamiques nécessitant l'utilisation de complexes métalliques qui réagiront avec la lumière pour détruire sélectivement des tissus tumoraux. Parmi les photosenseurs en développement clinique, on retrouve, entre autres, des complexes à l'étain (VI) ainsi que les texaphyrines, sortes de porphyrines étendues, au gadolinium (III) ou au lutétium (III)⁵⁶³.

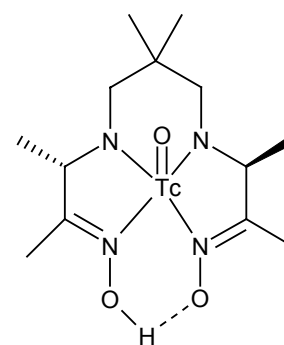


Figure 4.8. Le Ceretec est un exemple de complexe au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, servant au diagnostic des accidents vasculaires cérébraux.

... permettant des applications thérapeutiques au cuivre

Parmi les métaux utilisés en médecine, le cuivre et ses complexes occupent une place de choix⁵⁶⁴. On distingue principalement trois types d'utilisation thérapeutique du cuivre (principalement sous sa forme Cu^{2+}) : dans le traitement des inflammations, des agressions infectieuses ou encore de certains cancers.

Le traitement des maladies inflammatoires, comme l'arthrite rhumatoïde, est associé depuis les temps anciens à un régime alimentaire riche en cuivre, ou à l'application d'onguents et au port de bracelets de cuivre⁵⁶⁵. Le cuivre est de fait intimement lié aux processus d'inflammation, mais son rôle précis reste à déterminer. En effet, on constate une augmentation de la concentration physiologique totale de ce métal dans les tissus enflammés. De plus, nous avons vu que, dans le sang, les ions cuivriques sont complexés à différentes protéines plasmatiques comme l'albumine ou la céruloplasmine. Lors de l'inflammation, les proportions de cuivre transporté par chacune de ces protéines changent, résultant finalement en une diminution de sa biodisponibilité. On ne peut cependant pas dire à l'heure actuelle si ces variations reflètent ou non une réponse de l'organisme au traumatisme inflammatoire.

Ces incertitudes proviennent du fait que le cuivre est un métal qui peut osciller entre différents étages d'oxydation. Il intervient notamment dans le mécanisme de la superoxyde dismutase qui neutralise certains radicaux libres impliqués dans les dommages oxydatifs subis par l'organisme lors de l'inflammation. Mais il peut aussi être impliqué dans des réactions de type Fenton ou Haber-Weiss, générant des espèces oxydantes destructrices. A ce niveau, ce sont sans doute les ligands des ions cuivriques qui vont déterminer leur comportement pro ou antioxydatif. Ainsi, beaucoup d'anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (AINS), tels que l'aspirine et ses dérivés, ont une activité accrue et présentent moins de toxicité gastro-intestinale lorsqu'ils sont complexés au cuivre⁵⁶⁴⁻⁵⁷¹. Si la structure de ces complexes à l'état solide est bien connue (Figure 4.9.), leur comportement dans les fluides biologiques et leur mécanisme d'action doit encore être éclairci. Plusieurs hypothèses sont actuellement formulées. Parmi elles, on peut citer une action semblable aux AINS non complexés, se jouant au niveau des cyclooxygénases I et II, un accès facilité des complexes aux sites d'inflammation, ou encore une activité mimant celle de la superoxyde dismutase.

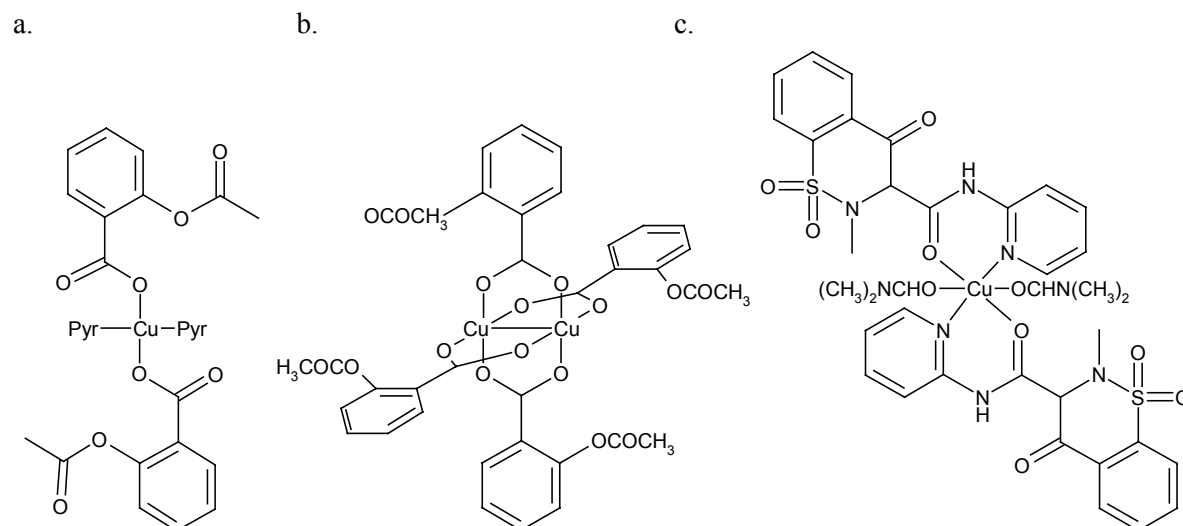


Figure 4.9. Anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques complexés au cuivre (II)⁵⁶⁵. Deux types de complexation ont été relevés pour l'aspirine: a. un complexe mononucléaire à deux ligands, b. un complexe binucléaire à quatre ligands. En c., on retrouve la structure du piroxicam, un anti-inflammatoire très répandu, complexé au cuivre. Notons ici les similitudes structurales existant entre le piroxicam et le ligand **L1** étudié au cours de cette thèse.

L'action antimicrobienne du cuivre et de ses complexes constitue un deuxième champ d'application thérapeutique⁵⁶⁴. Tout comme son action anti-inflammatoire, elle est connue depuis l'antiquité : en 3000 AC, les égyptiens stérilisaient déjà l'eau avec du cuivre. Plus récemment, on mit en évidence dans les années 1920 que les ouvriers travaillant dans les mines de cuivre souffraient moins de tuberculose que le reste de la population. Cette observation conduisit à l'utilisation fructueuse de complexes au cuivre dans le traitement de cette maladie pendant l'entre deux guerres. Actuellement, on constate une activité accrue de nombreux agents anti-infectieux lorsqu'ils sont complexés au cuivre⁵⁶⁴ (par exemple, voir les références⁵⁷²⁻⁵⁸²). On peut attribuer à ces complexes aussi bien des effets antiviraux, qu'antibactériens, fongicides, etc.... Leur mode d'action n'est cependant pas entièrement élucidé même si on suppose notamment que la formation de complexes favorise le passage au travers des membranes biologiques des micro-organismes impliqués dans les maladies infectieuses.

Enfin, la recherche anticancéreuse, forte du succès du cisplatine et de ses dérivés, explore de plus en plus les potentialités des complexes métalliques. Dans ce domaine également, le cuivre et ses complexes occupent une place de choix. Plusieurs exemples intéressants peuvent être cités : les complexes formés à partir de dérivés de thiosemicarbazones (Figure 4.10.a.) sont connus depuis plusieurs décennies⁵⁸³⁻⁵⁹³. On pense notamment qu'ils agissent en tant qu'inhibiteurs de la ribonucléotide réductase,

un enzyme clé intervenant dans la synthèse de l'ADN. Une classe plus récente d'agents anticancéreux est celle des Casiopeinas⁵⁹⁴⁻⁵⁹⁷, dont le dérivé le plus prometteur, le Casiopeina II-Gly est repris à la figure 4.10.b. Ces complexes au cuivre affectent également la réplication de l'ADN et de l'ARN.

L'ADN peut en outre être clivé par des complexes à base d'hydroxy-salicylidène-éthylènediamine (Salen) (Figure 4.10.c.)^{598,599}. Ces complexes Salen-Cu sont couplés à des groupements chimiques permettant un ancrage dans l'ADN. Le clivage est ensuite initié par un mécanisme d'oxydoréduction générant des radicaux libres. La bléomycine est un produit naturel utilisé dans le traitement de nombreux cancers humains (Figure 4.10.d.). Tout comme les Salen, elle complexe du cuivre ou du fer et possède un domaine d'ancrage à l'ADN. Ici aussi, les réactions d'oxydoréduction générées à proximité de l'ADN y entraînent de sérieux dommages⁶⁰⁰⁻⁶⁰².

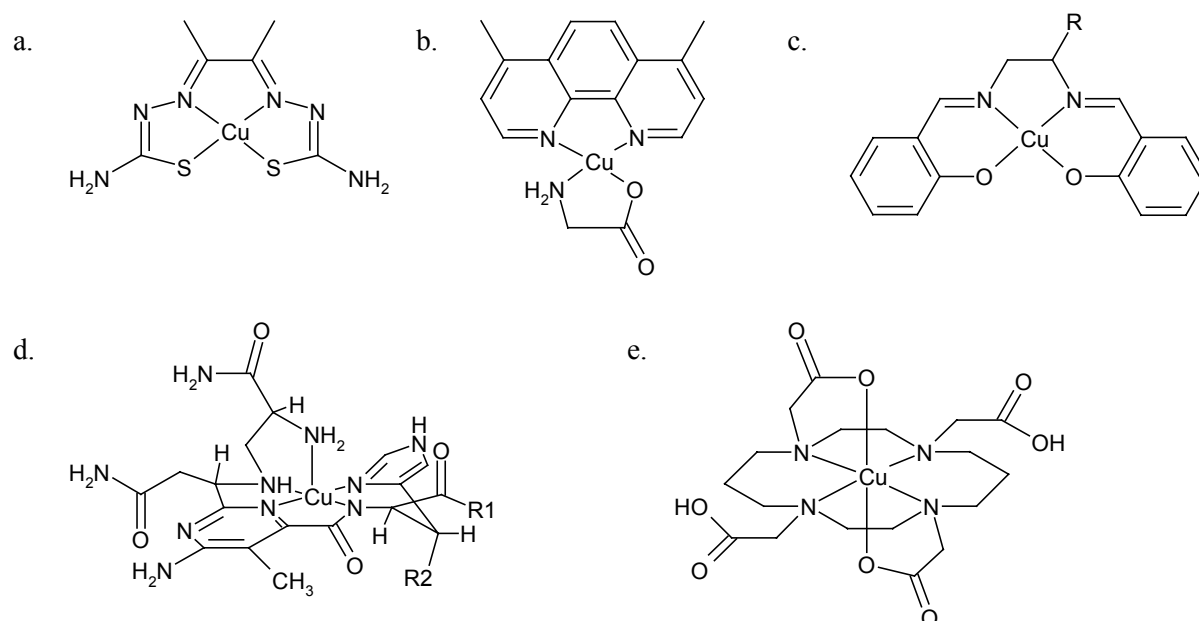


Figure 4.10. Exemples de complexes au cuivre utilisés dans le traitement du cancer. a. Complexe d'un ligand de type thiosemicarbazone avec le cuivre. b. Casiopeina II-Gly. c. Molécule bi-fonctionnelle formée par un complexe au cuivre avec un ligand de type salen, la fonction R servant à ancrer la molécule dans le double brin d'ADN. d. Domaine de liaison métallique au sein de la Bléomycine, avec R1 et R2 correspondant respectivement à un domaine de liaison à l'ADN et à un dissacharide. e. Complexe Cu-TETA, les groupements carboxylates non chelatants servant au couplage à un peptide ou un anticorps.

Enfin, on utilise largement les complexes au cuivre en radiothérapie et en imagerie médicale⁶⁰³⁻⁶⁰⁶. En effet, de nombreux isotopes radioactifs du cuivre (⁶²Cu, ⁶⁴Cu et ⁶⁷Cu) ont diverses applications médicales car ils émettent des particules β ou des électrons Auger utilisés en radiothérapie, ou encore des rayons γ nécessaires aux techniques d'imagerie. Ainsi, le ⁶⁷Cu est utilisé dans le marquage d'anticorps conjugués car il émet à la fois des rayons β exploités en radio-immunothérapie et des rayons γ permettant de visualiser les tumeurs. Ici aussi, une technique largement utilisée est de coupler un complexe au cuivre radioactif (comme le Cu-TETA illustré à la figure 4.10.e.) avec une autre molécule, par exemple un anti-corps, pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. On peut également marquer directement un complexe actif, comme, par exemple, un complexe thiosemicarbazone-Cu qui atteindra de lui-même sa cible biologique.

Au terme de ces quelques paragraphes, plusieurs conclusions s'imposent. La chimie bio-inorganique est une discipline relativement jeune mais en pleine expansion. A l'heure actuelle, il ne fait aucun doute que les métaux sont indispensables à de nombreux processus biologiques, mais leurs fonctions, leurs métabolismes et leurs modes d'action au sein des organismes vivants commencent seulement à être élucidés.

Parallèlement, la médecine exploite de plus en plus les propriétés particulières des métaux et de leurs complexes. Le champ d'investigation de la chimie médicinale classique, traditionnellement focalisé sur les quelques éléments courants que sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, le soufre et l'azote, s'ouvre désormais sur de nouveaux horizons.

Cependant, si l'utilisation de métaux offre de nouvelles perspectives dans la conception de médicaments, elle requiert la connaissance des principes fondamentaux de chimie inorganique, nécessite des techniques adaptées et pose parfois des problèmes qu'on ne traite habituellement pas en chimie médicinale classique. Lorsque l'on travaille en milieu physiologique, il faut tenir compte des comportements particuliers des composés métalliques. Ceux-ci sont caractérisés par une certaine stabilité thermodynamique et cinétique, par une capacité à osciller entre plusieurs étages d'oxydation et à réagir ainsi avec leur environnement, par une toxicité intrinsèque...

Appréhender cette complexité peut sembler ardu de prime abord mais apporte une richesse indéniable. Les applications fructueuses de la chimie bio-inorganique en médecine ne manquent pas: elles vont du traitement du cancer, à la mise au point

d'inhibiteurs enzymatiques ou d'agents de diagnostic. L'exploitation de quasi tous les éléments du tableau périodique a été envisagée dans la conception de complexes à intérêt pharmaceutique. Parmi eux, le cuivre occupe une place de choix. Utilisé depuis des millénaires pour traiter les maladies infectieuses et inflammatoires, il fait aujourd'hui l'objet de recherches poussées dans de nombreux domaines de la chimie médicinale.

Nous nous sommes inscrite, tout au long de cette thèse, au sein de cette discipline passionnante qu'est la chimie bio-inorganique en étudiant le comportement de complexes au cuivre, inhibiteurs potentiels de la protéase du VIH-1. Nous verrons au cours des chapitres suivants que cette caractérisation nécessite des techniques adaptées à ce métal, tant du point de vue théorique qu'expérimental.

Voilà maintenant deux décennies que l'épidémie du SIDA, due au virus d'immunodéficience humaine, fait rage et se répand dans toutes les régions du monde. Face à ce fléau, la communauté scientifique internationale s'est rapidement mobilisée : une vingtaine de médicaments sont aujourd'hui disponibles pour traiter les personnes infectées. Utilisés le plus souvent en combinaison, ils visent principalement deux enzymes clés indispensables à la réplication du virus, la transcriptase inverse et la protéase.

L'euphorie qui a accompagné la découverte des premiers anti-VIH est cependant retombée. Si ces médicaments apportent aux malades l'espoir d'un retour à une vie normale et reculent l'échéance fatale, ils ne conduisent malheureusement pas à une guérison définitive. Tôt ou tard, le virus produit des mutations qui rendent le traitement inefficace. Il est alors indispensable de se tourner vers d'autres molécules actives contre le virus mutant. L'arsenal thérapeutique s'amenuise progressivement : au bout de quelques années, certains patients sont réfractaires à tout traitement. Des problèmes de toxicité et de biodisponibilité viennent en outre se greffer sur ce point d'achoppement.

Alors que les recherches d'un vaccin préventif susceptible d'enrayer la progression fulgurante de l'épidémie piétinent, de grands espoirs se portent sur la découverte de nouvelles familles d'inhibiteurs enzymatiques, plus efficaces, actives contre les différentes souches mutantes et présentant moins d'effets secondaires.

Durant cette thèse, nous avons tenté d'apporter une contribution à cette recherche, en nous tournant vers le développement d'une famille originale d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1.

La protéase est une cible de choix dans la lutte contre le VIH-1. En effet, cette protéine est indispensable à la réplication virale. Elle appartient à une famille enzymatique très connue -la famille des protéases à acides aspartiques-, et fait actuellement partie des protéines dont la structure et le mode d'action ont été les plus caractérisés.

Dans ce contexte, une approche de '*de novo* drug design' a été entreprise au sein du laboratoire CMS. Elle a mené à l'identification d'une molécule chef de file, le complexe métallo-organique au cuivre (II) SETCEZ, caractérisé par une faible activité inhibitrice ($K_i = 480 \pm 150 \mu\text{M}$)⁴⁸³. Le composé SETCEZ s'ancrerait, en effet, dans le site actif de la protéase en formant des interactions clés avec certains acides aminés stratégiques (Figure 1.).

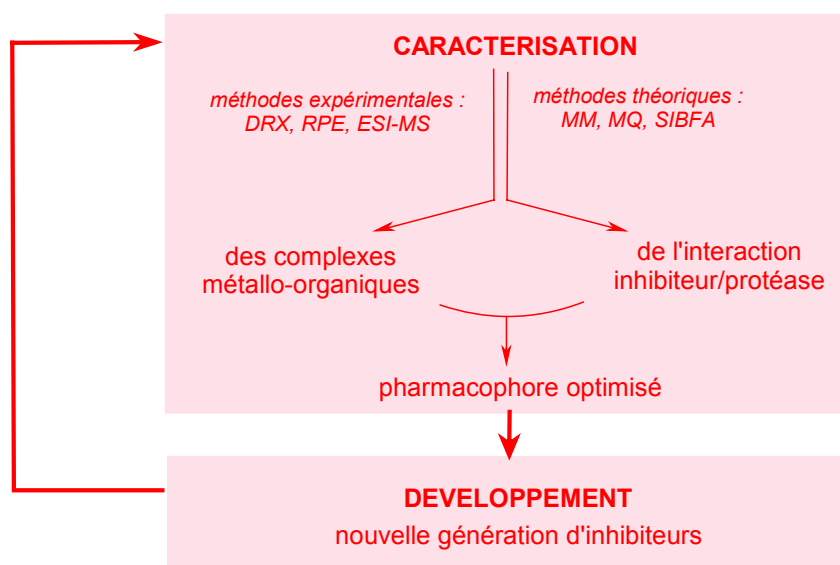
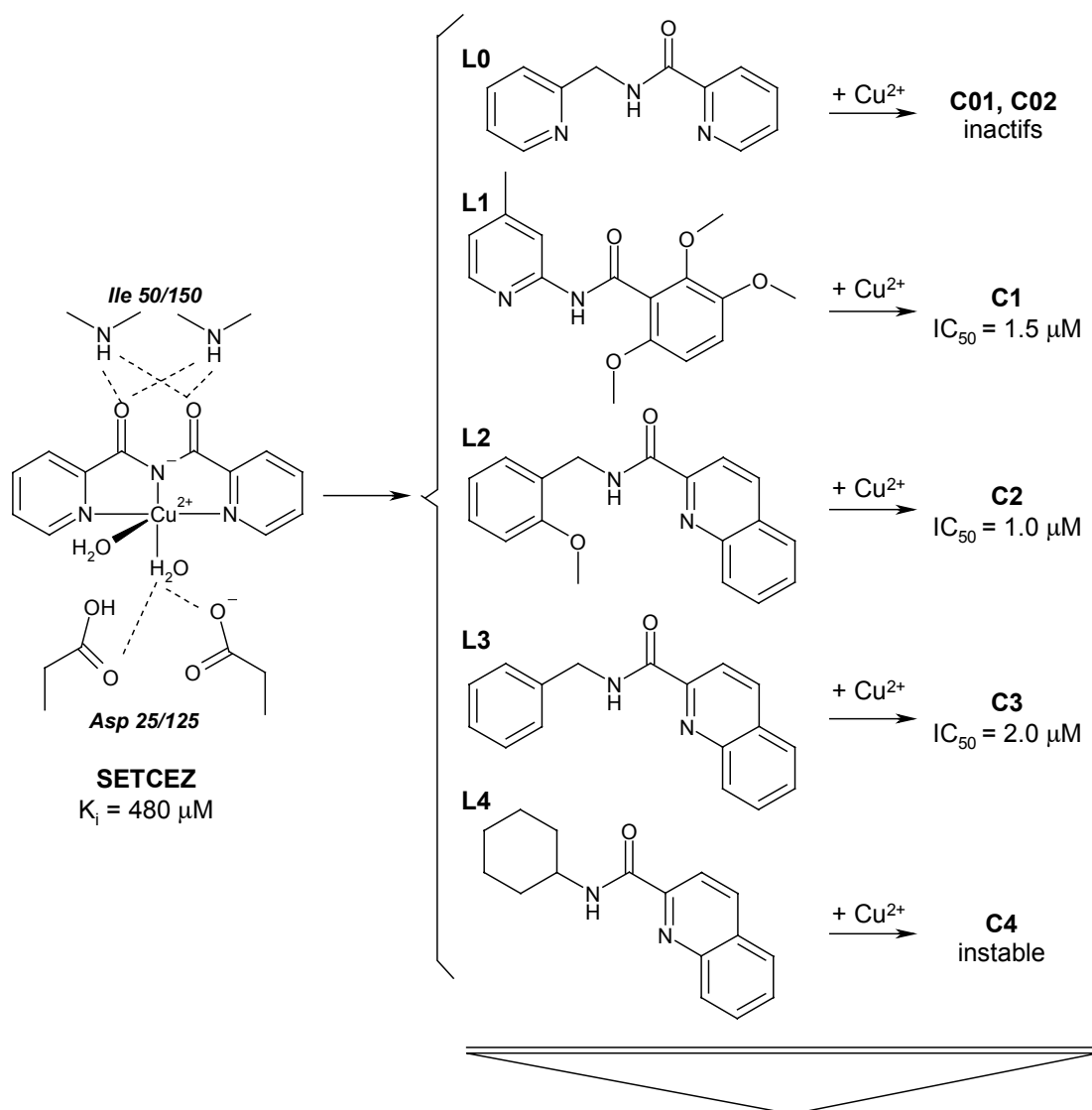


Figure 1. Stratégie adoptée lors de la caractérisation et du développement d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 de nature métallo-organique. Ce travail de thèse (en rouge) découle de l'analyse de résultats antérieurs obtenus au sein de notre laboratoire (en noir). Il peut déboucher sur un processus itératif.

D'une part, les deux groupements carbonyles formerait des ponts hydrogène avec les résidus Ile50/150 des flaps de l'enzyme, jouant ainsi le rôle de la molécule d'eau structurale présente dans tous les complexes inhibiteurs peptidomimétiques/protéase cocrystallisés. D'autre part, le cuivre complexerait directement la molécule d'eau impliquée avec les aspartates catalytiques (Asp25/125) dans le mécanisme de protéolyse de l'enzyme. C'est au niveau de cette deuxième caractéristique que réside toute l'originalité du projet. En effet, si on souhaite intégrer la molécule d'eau catalytique au sein d'un inhibiteur potentiel de la protéase, il faut se tourner vers les complexes métallo-organiques. Or, l'approche bio-inorganique n'a, jusqu'à présent, été que très superficiellement exploitée^{607,608} dans le cadre de la recherche d'antiprotéase du VIH-1; elle ouvre donc un champ d'investigation quasi vierge dans ce domaine.

Ce travail porte sur l'étude de complexes au cuivre (II), découlant de l'optimisation du composé tête de file, SETCEZ. Cette analyse requiert dès lors de prendre en compte les spécificités des complexes métalliques.

L'utilisation des métaux dans une stratégie de conception de médicaments n'est pas innocente : on ne peut pas étudier de la même manière une molécule organique classique et un complexe métallo-organique. A la caractérisation habituelle des drogues vient s'ajouter celle concernant les propriétés spécifiques des espèces métalliques, telles que leur aptitude à osciller entre différents étages d'oxydation, à former des complexes plus ou moins stables ou encore à échanger leurs ligands.

Par exemple, dans une approche classique, une étude structurale par diffraction des rayons X (DRX) donne accès à une conformation stable de la molécule étudiée à l'état solide. En solution, il est fort probable que la molécule reste sous cette forme, moyennant quelques adaptations conformationnelles. Par contre, dans le cas d'un complexe métallique, cette approximation n'est plus de mise. La DRX montre bien qu'il est possible de former le complexe observé, mais rien n'indique qu'il persistera dans cette configuration en solution : il peut y avoir décomplexation totale ou partielle des ligands, compétition entre plusieurs mode de complexation, etc... Il y a beaucoup de chance pour que cohabitent plusieurs espèces en solution, leurs proportions respectives dépendant de la stabilité des complexes formés mais également des caractéristiques du milieu dans lequel ils se trouvent (conditions de pH, présence de ligands compétiteurs, ...).

Le travail entrepris précédemment au sein de notre laboratoire conduisit à la synthèse de différents ligands découlant de l'optimisation du composé chef de file SETCEZ (Figure 1.). Ceux-ci furent ensuite complexés au cuivre (II), puis évalués biologiquement. Si les ligands, en tant que tels, n'avaient aucun pouvoir anti-protéolytiques, certains de leurs complexes révélèrent une activité inhibitrice prometteuse, près de 500 fois plus élevée que celle du composé chef de file. Cet excellent résultat semblait cependant difficilement explicable en envisageant une complexation semblable à celle de SETCEZ. Une étude structurale plus poussée était dès lors indispensable.

Le premier objectif de cette thèse vise à caractériser les propriétés physico-chimiques et structurales de la série de ligands repris à la figure 1 et des complexes qu'ils forment avec le cuivre (II). Par ailleurs, nous nous proposons de modéliser l'interaction de ces inhibiteurs avec la protéase du VIH-1 afin d'établir les relations existant entre leur structure et l'activité inhibitrice observée. Nous utiliserons, à cette fin, différentes techniques expérimentales et théoriques.

La conception de médicaments passe généralement par la détermination de la structure tridimensionnelle des inhibiteurs étudiés, et lorsque c'est possible, de celle qu'ils adoptent lors de leur interaction avec la protéine ciblée. La **diffraction des rayons X (DRX)** est une technique expérimentale largement utilisée pour appréhender la structure d'une molécule à l'état cristallin.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, dans le cas de composés métallo-organiques, cette étude à l'état solide doit être complétée par une caractérisation des complexes présents en solution. Les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent être citées comme outils de choix dans la détermination structurale des molécules en solution. Cependant, la présence d'un centre métallique paramagnétique tel que le cuivre (II) rend, la plupart du temps, inexploitable les données issues de la RMN. Parmi les autres méthodes de détermination structurale en solution, deux techniques ont été retenues : la **résonance paramagnétique électronique (RPE)** particulièrement adaptée à l'étude de l'ion cuivrique et la **spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS)** qui donne accès à la masse du complexe intact formé en solution.

Des études théoriques complètent idéalement cette détermination expérimentale. Ainsi la **mécanique moléculaire** (MM) permet de modéliser l'interaction entre un inhibiteur et la protéine cible. Par ailleurs, les propriétés électroniques de petites molécules peuvent être déterminées par **mécanique quantique** (MQ). Ces méthodes ont cependant certaines limites : si la mécanique moléculaire est largement utilisée lors de la conception rationnelle de médicaments, elle n'est cependant pas réellement adaptée pour traiter des systèmes comprenant des espèces métalliques. La mécanique quantique pourrait être une bonne alternative à ce problème ; malheureusement, elle n'est applicable, en des délais raisonnables, qu'à des molécules plus petites que les complexes que nous étudions. Dès lors, nous nous sommes tournés vers une méthode en développement, la méthode **SIBFA**, qui, bien qu'adaptée à l'étude des systèmes comprenant des espèces métalliques, garde la rapidité de calcul de la mécanique moléculaire. Cette méthode permet ainsi d'accéder à certaines propriétés particulières des complexes telle que leur stabilité en solution.

La caractérisation expérimentale et théorique, d'une part, des complexes à l'état solide et en solution, et d'autre part, de leur interaction avec la protéase, nous permettra de poser les critères nécessaires à une inhibition compétitive de l'enzyme. Ces critères seront repris au sein d'un pharmacophore optimisé qui pourra servir de base à la proposition d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de nature métallo-organique, selon la stratégie résumée à la figure 1.

Après un chapitre dédié à la présentation des différentes techniques expérimentales (diffraction des rayons X, résonance paramagnétique électronique et spectrométrie de masse à ionisation par électrospray) et théoriques (mécaniques moléculaire et quantique, et méthode SIBFA) que nous avons utilisées au cours de cette thèse, nous nous focaliserons sur les résultats obtenus. Ceux-ci peuvent se subdiviser en trois parties.

Dans un premier temps, nous nous attacherons à déterminer la structure des complexes **C0-4** à l'état cristallin. Nous étudierons leur interaction avec la protéase du VIH-1 à l'aide des techniques de mécanique moléculaire. A la lumière des résultats biologiques, nous poserons, à l'issue de ce chapitre, de premières hypothèses quant aux relations unissant la structure et l'activité de ces complexes.

L'utilisation de complexes métallo-organiques requiert, nous l'avons vu, de prendre en compte leurs propriétés spécifiques tel que leur comportement en milieu aqueux. Une étude en solution sera donc incontournable. Nous montrerons, au cours de ce deuxième chapitre, que la stabilité des complexes **C0-4** en milieu biologique est une donnée cruciale pour expliquer leur activité inhibitrice.

Dès lors, il est intéressant de pouvoir prédire la stabilité relative de différents complexes. Dans un troisième temps, nous décrirons l'adaptation du programme SIBFA à l'étude de complexes au cuivre (II). Nous verrons que la modélisation des complexes **C0-4** par la méthode SIBFA donne un éclairage nouveau à ce travail, tout en étant en accord avec les données expérimentales précédentes.

Enfin, en guise de conclusion, nous réunirons les critères structuraux permettant d'assurer une stabilité suffisante ainsi qu'une activité optimale à cette nouvelle classe d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Sur base de ce modèle, nous proposerons de nouveaux complexes métallo-organiques possédant potentiellement une meilleure activité antiprotéase.

What is now proved was once only imagined.

WILLIAM BLAKE

1. Méthodes expérimentales

1.1. *La diffraction des rayons X, méthode de caractérisation des complexes à l'état cristallin*

La diffraction des rayons X ⁶⁰⁹ est une technique expérimentale de choix pour caractériser la structure tridimensionnelle d'un composé à l'état cristallin, en association ou non avec d'autres molécules. En effet, la localisation des positions atomiques constituant un édifice moléculaire cristallin permet, d'une part, de décrire la géométrie d'une conformation stable (de basse énergie) du système en terme de longueur de liaison, d'angle de valence et d'angle de torsion. D'autre part, l'examen des forces intermoléculaires (interactions électrostatiques, ponts hydrogène, interactions π - π , contacts de van der Waals...) assurant la cohésion cristalline fournit des indications sur les liaisons faibles susceptibles d'être mises en jeu lors de l'interaction du ligand avec le récepteur, ce qui en fait un outil précieux lors de la conception de médicaments assistée par ordinateur⁶¹⁰.

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques caractérisées par des longueurs d'onde de l'ordre de l'angström (10^{-10} m). Elles sont produites à partir du bombardement d'une anode métallique par un faisceau d'électrons de haute énergie. Lors de la collision avec l'anode, les électrons incidents sont décélérés et génèrent une radiation électromagnétique comprise dans un intervalle de longueur d'onde associé aux rayons X, appelée "bremsstrahlung" ou rayonnement de freinage. Par ailleurs, ils provoquent une réorganisation électronique des couches internes des atomes de l'anode. Cette réorganisation se traduit par l'émission de rayons X d'une longueur d'onde caractéristique qui peuvent être utilisés lors des expériences de diffraction. Ainsi, dans le cadre de ce travail, nous avons employé une anode de cuivre émettant un rayonnement X de 1.54178 Å.

Lorsqu'ils traversent un milieu matériel, les rayons X donnent lieu à différents phénomènes physiques, dont la réfraction, la fluorescence, l'absorption, la diffusion de Compton ou encore la diffusion de Rayleigh qui est à l'origine de la diffraction des rayons X par les cristaux. Elle est caractérisée par une mise en vibration forcée des électrons du milieu traversé, qui réémettent alors un rayonnement de même longueur d'onde dans l'espace qui les entoure. Dans un milieu cristallin, donc périodique, ce phénomène initialement continu de diffusion est transformé en phénomène discontinu de diffraction : le faisceau de rayons X n'est renvoyé par le cristal que dans des

directions de l'espace bien particulières, en fonction de sa structure. L'étude des directions de diffraction permet, dès lors, d'accéder aux paramètres de maille (volume, groupe spatial, multiplicité) d'un cristal. Par ailleurs, l'analyse des intensités des rayons diffractés renseigne sur la répartition de la densité électronique au sein du cristal et permet donc de déterminer la position des atomes dans la maille. En pratique, la détermination d'une structure cristalline se déroule en plusieurs étapes : le traitement initial des données, la résolution d'une structure approchée, l'affinement de cette structure et, généralement, sa consignation au sein d'une banque de données structurale.

I. Traitement initial des données

Les intensités diffractées sont mesurées par un diffractomètre Enraf-Nonius CAD-4⁶¹¹. Le programme Nonius⁶¹² qui lui est associé convertit les intensités diffractées en intensités observées suivant la relation :

$$I_O = V [NC - 2 (BF_{gauche} + BF_{droite})] \quad \text{avec}$$

I_O : intensité observée
 NC : nombre de coups
 BF : bruit de fond
 V : vitesse d'enregistrement

Seules, les réflexions dont l'intensité est supérieure au double de la déviation standard estimée sont collectées. Ces intensités observées sont ensuite transformées en facteurs de structure observés, en tenant compte d'effets géométriques (facteur de Lorentz et polarisation) et physiques (absorption, extinction et double réflexion de Renninger). Les normes des facteurs de structure observés $|F_O|$, corrigés par les facteurs de Lorentz L et de polarisation P sont calculées selon l'équation :

$$|F_O| = \sqrt{\frac{I_O}{L \cdot P}} \quad \text{avec } L = 1/\sin(2\theta)$$

$P = 0.5 [1 + \cos^2(2\theta)]$
 θ : angle d'incidence des rayons X par rapport
 aux plans réticulaires du cristal

L'analyse statistique de Wilson permet ensuite d'estimer d'une part, le facteur d'échelle K qui existe entre les facteurs de structure observés F_O et les facteurs de structure calculés F_C sur base des coordonnées atomiques et, d'autre part, le facteur de température global B qui rend compte de l'agitation thermique des atomes autour de leur position d'équilibre. Ainsi, on peut écrire les relations suivantes :

$$|F_C|^2 = K |F_O|^2$$

et $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$ avec $\langle u^2 \rangle$: amplitude quadratique moyenne de la vibration atomique

II. Résolution de la structure

Le facteur de structure $F(\vec{H})$, dont le carré est proportionnel aux intensités des rayons diffractés, peut également être exprimé comme étant la somme vectorielle des facteurs de forme atomique f_k associés à chaque atome de la maille cristalline (f_k étant le rapport de l'amplitude diffusée par l'atome k par sur celle diffusée par un électron) :

$$F(\vec{H}) = \sum_k f_k \cdot e^{i2\pi (\vec{r}_k \cdot \vec{H})}$$

avec $\vec{r}_k = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c}$ (x, y, z = coordonnées fractionnaires)

vecteur du réseau direct renseignant sur la position de l'atome k dans la maille

et $\vec{H} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$ (h, k, l = coordonnées d'un nœud du réseau réciproque)

vecteur du réseau réciproque lié aux directions d'incidence et d'observation ainsi qu'à la longueur d'onde.

Si le contenu de la maille est considéré non plus comme une série d'atomes dispersés, mais comme une série de petits éléments de volume auxquels est associée une densité électronique ρ , le facteur de structure peut être écrit sous une autre forme :

$$F(\vec{H}) = V \iiint_{x,y,z} \rho(x,y,z) e^{i2\pi (hx+ky+lz)} dx dy dz$$

Lorsque les facteurs de structure sont connus, il est alors possible d'accéder à la densité électronique en effectuant une transformée de Fourier :

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(\vec{H}) e^{-i2\pi (hx+ky+lz)}$$

Cependant, l'observation des intensités ne permet d'obtenir que la norme du facteur de structure. Dès lors, l'information liée à la phase φ du facteur de structure F_O demeure inconnue. Elle est pourtant indispensable pour accéder à la structure cristalline. En effet,

$$F_O = |F_O| e^{i\varphi}$$

Pour contourner ce point d'achoppement, appelé problème des phases, on peut appliquer, grâce au programme SHELXL⁶¹³, des techniques telles que les méthodes directes ou la méthode de Patterson. On obtient, une fois la phase déterminée, les premières coordonnées atomiques d'une structure approchant la structure réelle.

III. Affinement de la structure

L'affinement de la structure approchée est effectué par la méthode des moindres carrés et par séries de Fourier successives. Après plusieurs cycles d'itérations, on obtient finalement la structure qui rend compte au mieux des résultats expérimentaux. La concordance entre la structure réelle et la structure proposée est traduite par un indice de désaccord final R qui doit être le plus faible possible.

$$R = \frac{\sum (|F_O| - |F_C|)}{\sum |F_O|}$$

avec $|F_C|$: norme du facteur de structure calculé sur base
des coordonnées atomiques.

Enfin, la visualisation de la structure cristalline et l'analyse de la géométrie de la molécule peuvent se faire grâce au programme PLATON⁶¹⁴.

IV. Consignation des structures cristallines

La banque de données structurales de Cambridge (CSD)⁶¹⁵ regroupe les structures cristallines d'environ 300000 molécules organiques ou métallo-organiques, ayant fait l'objet de publications. Elle constitue, dès lors, une source d'informations non négligeable. Cette base peut être interrogée de différentes manières (recherche par fragment, mot-clé, connectivité...) et peut servir à des analyses statistiques de propriétés géométriques telles que les distances interatomiques, les angles de torsion, ou encore la géométrie des ponts hydrogène.

1.2. La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray, moyen d'appréhender un mode de complexation en solution

Le principe général de la spectrométrie de masse⁶¹⁶ se base sur l'utilisation d'un champ magnétique et/ou électrique pour ioniser et séparer des molécules dans l'espace selon leur rapport masse sur charge (m/z), où m est la masse de l'ion exprimé en unité de masse atomique ou en dalton, et z le nombre de charges élémentaires qu'il porte.

La figure 1.1. reprend les différents composants de base d'un spectromètre de masse. Une fois que l'échantillon est introduit dans l'instrument, il y subit une ionisation. La molécule chargée est alors propulsée électrostatiquement dans l'analyseur qui sépare les ions suivant leur rapport masse sur charge. Le signal enregistré au détecteur est ensuite transmis à un ordinateur qui permet de stocker et de traiter les informations obtenues.

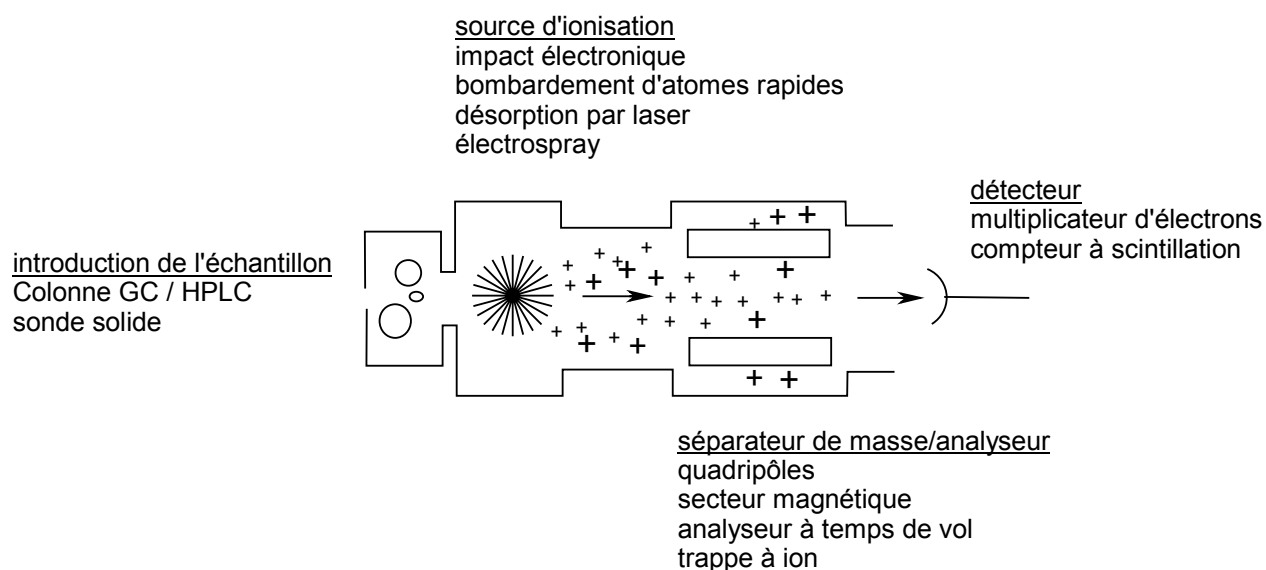


Figure 1.1. Représentation schématique d'un spectromètre de masse (d'après G. Siuzdak⁶¹⁶).

La détermination précise des poids moléculaires par spectrométrie de masse fournit de nombreuses informations liées à la structure, la composition et la pureté des espèces chimiques étudiées.

La qualité des résultats obtenus dépend cependant intimement de la méthode d'ionisation utilisée. En effet, les ions sont générés en induisant la perte ou le gain d'une charge soit par éjection d'électron, soit par protonation ou déprotonation. Jusqu'à dans les années 80, seuls les composés volatils de faible masse moléculaire pouvaient

être ionisés et passer en phase gazeuse, au moyen de techniques telles que l'ionisation par impact électronique (EI), ou l'ionisation chimique en phase gazeuse. Ces méthodes provoquent typiquement une fragmentation de l'espèce étudiée et sont largement utilisées lors de la caractérisation des petites molécules organiques. De nouvelles techniques d'ionisation telles que le bombardement d'atomes rapides (FAB) ou la spectrométrie de masse par ionisation secondaire (SIMS) firent ensuite leur apparition, permettant de produire l'ion moléculaire intact de composés ayant une masse inférieure à 4000 Da. Enfin, la mise au point des méthodes d'ionisation par désorption par laser (MALDI) et par électrospray (ESI) permirent d'appréhender la caractérisation des molécules biologiques de haut poids moléculaire telles que les protéines.

L'ionisation par électrospray consiste à produire des molécules ionisées en phase gazeuse à partir d'une solution liquide⁶¹⁶⁻⁶²¹. En effet, un électrospray est produit en appliquant un fort champ électrique, à pression atmosphérique, à un liquide passant à travers un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu en appliquant une différence de potentiel d'environ 3000 V entre ce capillaire et une contre-électrode. Il provoque une accumulation de charges à la surface du liquide située à l'extrémité du capillaire, qui va dès lors se rompre pour former un spray de fines gouttelettes hautement chargées (Figure 1.2.a.).

Les gouttelettes vont ensuite être attirées électrostatiquement à l'intérieur du spectromètre. Elles seront au préalable soumises à un flux de gaz sec et/ou à une augmentation de température qui vont provoquer l'évaporation du solvant et donc la diminution de leur taille. L'accumulation de charges électriques dans chaque gouttelette, combinée à l'évaporation progressive des solvants conduit à un point où les répulsions coulombiennes sont supérieures à la tension de surface du liquide. Ce phénomène provoque une déformation en "cône de Taylor" de la goutte et *in fine* l'expulsion des molécules ionisées (Figure 1.2.b.).

L'ionisation par électrospray est une technique de choix pour étudier des molécules inorganiques telles que les complexes qui font l'objet de cette thèse^{621,622}. En effet, on peut relever plusieurs avantages à cette méthode d'ionisation. Tout d'abord, elle permet une caractérisation structurale des molécules telles qu'elles existent en solution, quel que soit le solvant utilisé⁶¹⁷. D'autre part, cette technique très douce permet d'éviter le phénomène de fragmentation typique de la spectrométrie de masse classique. On peut ainsi visualiser l'ion moléculaire intact et, dans le cas de complexes métallo-organiques, conserver les liaisons non covalentes métal/ligand. Les métaux de transition ont en outre plusieurs isotopes d'abondance naturelle appréciable - par exemple, le cuivre est constitué de 69.09 % de ⁶³Cu et de 30.91% de ⁶⁵Cu - dont les

proportions relatives peuvent être facilement identifiées sur un spectre obtenu par ESI-MS. Enfin, comme beaucoup de complexes métallo-organiques sont, par nature, déjà chargés, ils peuvent être observés directement dans des conditions d'ionisation très douces.

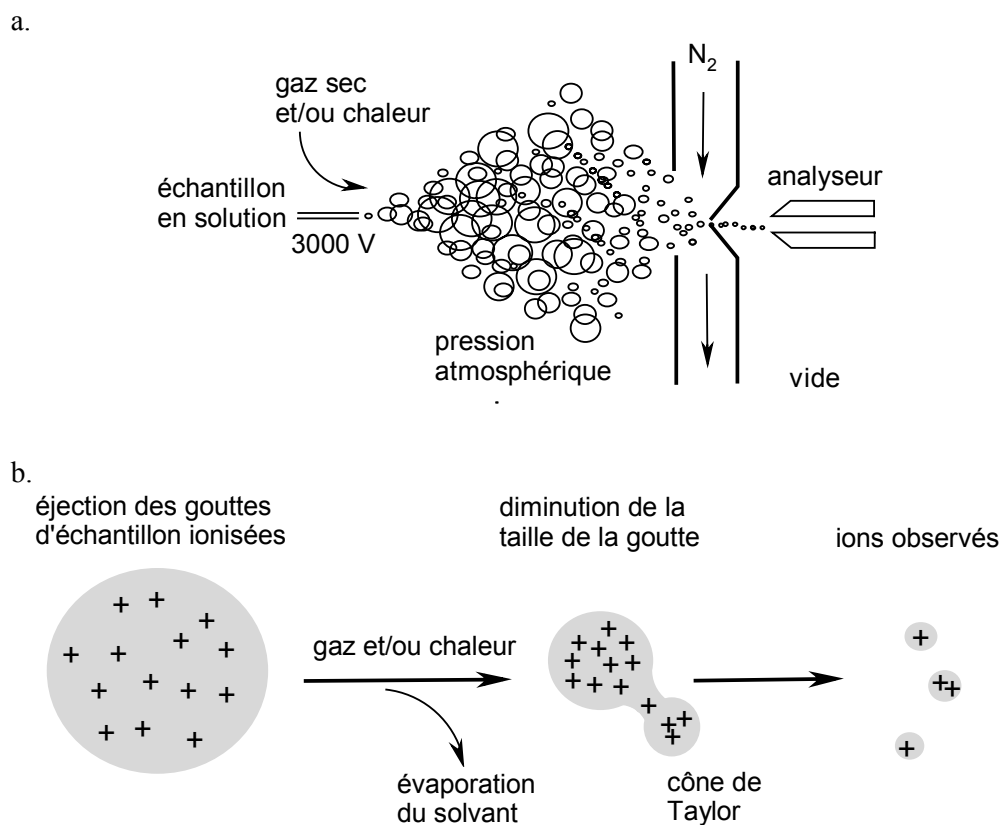


Figure 1.2. Ionisation par électrospray (d'après G. Siuzdak⁶¹⁶).
a. Nébulisation de l'échantillon. b. Formation des ions.

Au cours de cette thèse, les expériences de spectrométrie de masse furent réalisées au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire des FUNDP sur un spectromètre Platform II (Waters/Micromass, Manchester, UK). L'ionisation en mode positif (observation de cations) a été menée dans les conditions suivantes : injection de l'échantillon au travers d'un capillaire de 75 μm de diamètre à un débit de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$; différence de potentiel de 3.01 kV ; analyseur à quadripôle simple.

1.3. *La résonance paramagnétique électronique, technique dédiée à la caractérisation des complexes au cuivre(II)*

Le phénomène de résonance magnétique⁶²³ décrit l'interaction entre la matière et un champ magnétique. On peut l'observer à l'échelle du noyau dans les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou à l'échelle des électrons gravitant autour de ce noyau. On parlera alors de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Les complexes au cuivre (II) sont des espèces paramagnétiques et peuvent dès lors être caractérisées par RPE. En effet, l'ion cuivrique a une configuration électronique en d^9 , ce qui signifie qu'un électron non apparié est présent sur sa dernière couche électronique. Or, cet électron possède un moment magnétique $\vec{\mu}$ lié au moment angulaire de spin \vec{S} par la relation suivante:

$$\vec{\mu} = -g \frac{e h}{4\pi m c} \vec{S} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} g : \text{facteur de proportionnalité de Landé} \\ \text{(vaut 2.00232 pour l'électron libre)} \\ e : \text{charge de l'électron} \\ h : \text{constante de Planck} \\ m : \text{masse de l'électron} \\ c : \text{vitesse de la lumière} \end{array}$$

le rapport $eh/4\pi mc$ étant généralement plus connu sous le nom de magnéton de Bohr, β . Remarquons ici que, comme l'électron possède une charge négative, contrairement au noyau observé en RMN, son moment magnétique et son spin ont une même direction mais des sens opposés, ce qui se traduit par un signe négatif dans l'expression ci-dessus.

Le nombre quantique de spin étant de $\frac{1}{2}$, \vec{S} ne prend que deux directions par rapport à un champ magnétique directeur \vec{B}_0 , correspondant au nombre quantique magnétique $m_s = S_z = \pm \frac{1}{2}$. En absence de champ, ces deux directions possèdent la même énergie. Mais, lorsque l'on soumet un électron à un champ magnétique \vec{B}_0 , aux deux orientations (parallèle et antiparallèle à \vec{B}_0) correspondent deux niveaux d'énergie distincts qui dépendent de la magnitude de ce champ (Figure 1.3.). Cette levée de dégénérescence, qui provoque l'apparition d'un état fondamental et d'un état excité, est communément appelée effet Zeeman.

Le principe de la RPE consiste à induire une transition entre ces niveaux énergétiques par une onde électromagnétique polarisée perpendiculairement à \vec{B}_0 et possédant une fréquence appropriée (Figure 1.3.).

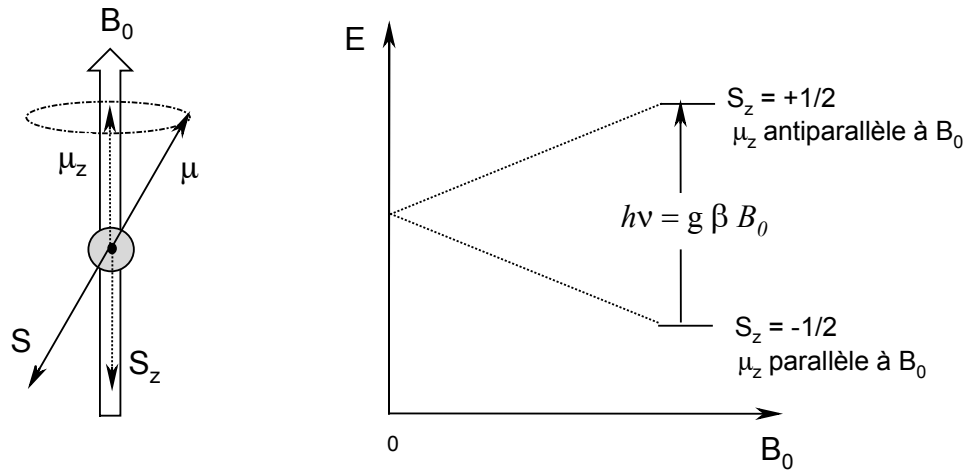


Figure 1.3. Représentation schématique du comportement d'un électron dans un champ magnétique. Deux états de spin d'énergie différente peuvent être observés : c'est l'effet Zeeman. Une transition entre ces deux niveaux est produite si on applique une onde électromagnétique de fréquence caractéristique perpendiculairement au champ B_0 : c'est le phénomène de résonance.

Comme l'énergie d'un moment magnétique dépend de sa projection le long du champ magnétique, on peut facilement énoncer les conditions de résonance :

$$\begin{aligned}
 E &= -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \\
 \vec{\mu} &= -g \beta \vec{S} \\
 \Rightarrow \quad \Delta E &= h\nu = g \beta B_0
 \end{aligned}$$

En pratique, plutôt que d'entreprendre une étude systématique des fréquences de résonance pour un champ magnétique donné, il est plus facile expérimentalement de faire varier le champ en fixant la fréquence. Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé à une fréquence de 9.55 GHz, le champ magnétique étant centré sur 3120 G.

L'interprétation des spectres repose principalement sur deux paramètres : la valeur du facteur g et la constante de couplage hyperfin A .

Le facteur g spécifie la position d'absorption spectrale d'une espèce magnétique particulière. Mais cette position dépend aussi de l'environnement dans lequel se trouve cette espèce. En d'autres termes, le moment magnétique d'un électron dépend non seulement de son spin mais, également, dans une certaine mesure, de son mouvement orbitalaire à l'intérieur de l'atome. A cause de ce couplage spin-orbite, le facteur g va varier en fonction de l'entourage de l'électron et s'éloignera donc plus ou moins de la valeur de 2.00232 caractérisant l'électron libre.

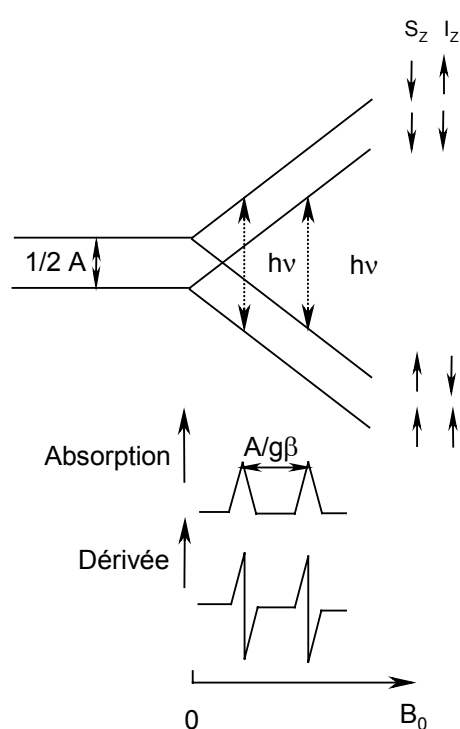


Figure 1.4. Interaction hyperfine entre un spin électronique (S_z) et spin nucléaire (I_z) valant $1/2$. Le spectre résultant de ce couplage est habituellement présenté sous la forme de la dérivée de l'absorption.

Par ailleurs, si l'espèce paramagnétique contient des noyaux possédant un moment magnétique, l'électron est couplé à ces moments. Ce phénomène, appelé couplage hyperfin, provoque une multiplicité de raies. Comme la règle de sélection veut que seuls les électrons peuvent changer de spin mais pas les noyaux ($\Delta m_s = \pm 1$ et $\Delta m_l = 0$), on observe une multiplicité en $2I + 1$, I correspondant au spin nucléaire (Figure 1.4.). Prenons par exemple le cuivre : il possède un spin nucléaire de $3/2$; son spectre RPE présente dès lors typiquement quatre bandes d'absorption. On caractérise généralement la structure hyperfine par la constante de couplage hyperfin A , calculée expérimentalement à partir de la distance séparant les bandes d'absorption. L'amplitude de ce couplage dépend par ailleurs de la géométrie et du type de liaison affectant le centre paramagnétique. Elle donne donc accès à des informations structurales particulièrement intéressantes.

Lorsque plusieurs noyaux possédant un spin nucléaire avoisinent le centre paramagnétique, la démultiplication des raies devient plus difficile à analyser. Dans le cas des métaux de transition, la structure hyperfine principale provient du noyau de l'ion paramagnétique ; mais une structure 'super-hyperfine' secondaire causée par les noyaux des ligands peut s'y superposer. Pour interpréter ces spectres plus complexes, il est parfois utile de recourir à des logiciels de simulation de spectre.

Les spectres présentés dans le cadre de cette thèse ont été obtenus au Centre de l'Oxygène de l'Ulg, au moyen d'un spectromètre Bruker ESP 300 E, en bande d'hyperfréquence X.

2. Méthodes théoriques

2.1. *La mécanique quantique, permettant la détermination des propriétés électroniques des ligands*

Les méthodes de modélisation basées sur la mécanique quantique visent à décrire le système étudié par une fonction d'onde Ψ ⁶²⁴. Celle-ci n'a pas de signification physique en tant que telle, mais son carré caractérise la probabilité de trouver un électron dans un volume donné.

En résolvant l'équation de Schrödinger, on peut accéder à la fonction d'onde Ψ associée à un système stationnaire (indépendant du temps) ainsi qu'à son énergie E .

$$H \Psi(r) = E \Psi(r)$$

L'opérateur hamiltonien H agissant sur la fonction d'onde correspond, dans sa forme complète, à une somme d'opérateurs qui rendent compte des énergies cinétiques des noyaux, des énergies cinétiques des électrons et des énergies électrostatiques entre noyaux et électrons. Malheureusement, on ne peut résoudre exactement l'équation de Schrödinger que dans le cas de systèmes très simples tels qu'une particule enfermée dans une boîte ou l'atome d'hydrogène. Pour les systèmes polyélectroniques, différentes approximations doivent être introduites afin d'estimer des valeurs approchées des fonctions d'onde et des énergies qui y sont associées.

L'approximation de Born-Oppenheimer permet de traiter séparément le mouvement des noyaux et des électrons. En effet, le terme d'énergie cinétique contenu dans l'opérateur hamiltonien est inversement proportionnel à la masse de la particule traitée. La masse des protons et des neutrons étant nettement supérieure à celle des électrons, la contribution des noyaux atomiques dans l'opérateur d'énergie cinétique peut être négligée. En pratique, cette approximation permet de se concentrer sur les comportements électroniques : comme les électrons bougent dans un champ de noyaux fixes, on peut découpler le mouvement des noyaux de celui des électrons.

En dépit de cette première approximation, il est toujours impossible de résoudre l'équation de Schrödinger en raison du terme d'énergie de répulsion électronique qui dépend simultanément des coordonnées de deux électrons. Afin de pallier cet inconvénient, on considère que les électrons évoluent de façon indépendante et on néglige les répulsions entre électrons. Dans ces conditions, la fonction d'onde Ψ est

considérée comme un produit de fonctions mono-électroniques appelées orbitales moléculaires.

D'autre part, le théorème des variations indique que la valeur estimée de l'énergie d'un système, obtenue grâce à une fonction d'onde approximative, est toujours plus élevée que la valeur exacte. Afin de déterminer la fonction d'onde la plus appropriée pour décrire un système, Hartree et Fock ont proposé de rechercher, par une méthode itérative, le jeu d'orbitales qui permet de minimiser l'énergie de ce système. Cette méthode, dite du champ autocohérent (méthode SCF), revient à considérer le mouvement indépendant de chaque électron dans un champ moyen d'électrons.

On peut résoudre les équations de Hartree-Fock suivant la méthode de Roothaan, selon laquelle les orbitales moléculaires sont développées en une combinaison linéaire d'orbitales atomiques (approximation LCAO, pour Linear Combination of Atomic Orbitals). Ces dernières sont décrites par des fonctions de Slater, ou bien, de façon à rendre l'obtention de solutions analytiques plus simples, par une combinaison de fonctions gaussiennes, appelée set de base. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé principalement le set de base 6-31g* implémenté dans le logiciel Gaussian 98⁶²⁵. Il correspond à une combinaison de six gaussiennes représentant les orbitales de cœur et de quatre gaussiennes (dont une plus diffuse) représentant les orbitales de valence. L'astérisque indique que des fonctions de polarisation ont été ajoutées, de manière à obtenir une meilleure description du système étudié.

L'un des principaux avantages de la mécanique quantique, par rapport aux autres techniques de modélisation moléculaire, est qu'elle ne fait appel qu'à un nombre minimal d'approximations et considère de manière explicite les électrons de la molécule étudiée. Cela permet le calcul *ab initio* (c'est-à-dire à partir des fondements de la mécanique quantique) de propriétés importantes telles que les charges atomiques, la topologie et l'énergie des orbitales frontières, les populations de recouvrement inter-atomique ou encore le potentiel électrostatique moléculaire.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressée principalement au dernier de ces descripteurs, le potentiel électrostatique moléculaire (PEM). Cette propriété représente l'énergie d'interaction entre la distribution des charges électroniques et nucléaires d'une molécule et une charge ponctuelle positive unitaire. Le potentiel $V(r)$ en un point de l'espace est défini par l'expression :

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r_1)}{|r_1 - r|} dr_1 \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Z_A : \text{charge nucléaire localisée en } R_A \\ \rho(r_1) : \text{densité électronique en } r_1 \end{array}$$

La détermination des potentiels électrostatiques moléculaires est particulièrement utile pour rationaliser les interactions entre molécules et les processus de reconnaissance moléculaire, tels que ceux intervenant lors de la formation d'un complexe métal/ligand.

2.2. La mécanique moléculaire, outil de modélisation de l'interaction inhibiteur/protéase

Les techniques de modélisation basées sur la mécanique quantique souffrent d'un inconvénient majeur : elles sont très coûteuses en terme de temps de calcul et ne sont dès lors applicables qu'à des systèmes moléculaires de taille restreinte. Au final, le temps nécessaire au traitement d'un système par les méthodes *ab initio* est environ proportionnel à la quatrième puissance du nombre d'électrons qu'il contient. L'utilisation de ces techniques peut s'avérer problématique pour l'étude d'objets macromoléculaires tel qu'un enzyme en interaction avec un inhibiteur ou encore pour la caractérisation de complexes métallo-organiques de grande taille, comme ceux qui font l'objet de cette recherche.

Par contre, la mécanique moléculaire⁶²⁶ considère l'énergie d'un système uniquement en fonction de ses positions atomiques. Cette approximation repose elle aussi sur les travaux de Born et Oppenheimer. En effet, l'approximation de Born Oppenheimer, en découplant les mouvements des noyaux et des électrons d'une molécule, postule que ces derniers peuvent s'adapter de manière quasi instantanée à la position des noyaux. Le fait d'ignorer les mouvements des électrons épargne ainsi un temps de calcul considérable.

En particulier, la mécanique moléculaire permet l'étude d'une gamme étendue de propriétés en décrivant l'énergie d'un système par la somme d'une série de contributions rendant compte des interactions intra et intermoléculaires. Pour chacune des contributions, des pénalités énergétiques sont appliquées lorsqu'une variable (par exemple une longueur de liaison ou un angle de valence) s'écarte de sa valeur de référence. L'ensemble de ces termes et des paramètres destinés à décrire chaque type d'atome rencontré constitue un champ de forces qui comporte généralement cinq contributions principales.

$$E = E_b + E_a + E_t + E_o + E_{nb}$$

- **l'élongation des liaisons**, E_b , est un terme destiné à réguler la distance entre deux atomes liés de façon covalente. A l'origine, cette contribution a été exprimée sous forme d'un potentiel de Morse ou, de manière à simplifier les calculs, par un potentiel harmonique (en x^2) issu de la loi de Hooke qui décrit l'énergie associée à la déformation d'un ressort. Par analogie, les champs de force sont souvent comparés à des modèles assimilant les atomes à des boules reliées entre elles par des ressorts.

- la **déformation des angles de valence**, E_a , est fréquemment représentée par une expression similaire à celle de l'élongation de liaison et comporte souvent un terme en θ^2 .
- la **modification des angles dièdres** (angles de torsion), E_t , impose l'utilisation d'un terme périodique. Une expression calculant l'énergie du système en fonction de $\sin\phi$ et/ou $\cos\phi$ est généralement utilisée.
- les **interactions hors plan**, E_o , sont contenues dans un terme correctif destiné à assurer la coplanéité de certains groupements, tels que les systèmes aromatiques.
- les **interactions entre atomes non liés**, E_{nb} , sont généralement traitées par un terme représentant les forces de van der Waals et un terme électrostatique.

Un grand nombre de champs de forces récents ajoutent à ces cinq fonctions principales des termes dits "croisés", qui rendent compte du couplage des différentes déformations et permettent d'améliorer la précision des résultats obtenus. D'autres champs ajoutent également un terme spécialement dédié à la description des ponts hydrogène.

Il est important de noter que les champs de forces constituent une approche purement empirique⁶²⁷. Ils sont paramétrés de manière à ce que l'ensemble des différentes contributions permettent de reproduire des résultats expérimentaux et/ou des résultats obtenus à partir de calculs d'un niveau théorique plus élevé comme les calculs *ab initio*. Ce paramétrage s'adresse généralement à une catégorie particulière de composés. On peut ainsi trouver des champs de forces destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques, de macromolécules, de nucléotides ou encore permettant de couvrir les éléments de l'ensemble du tableau périodique.

Le champ de forces utilisé au cours de cette thèse pour modéliser les interactions entre la protéase du VIH-1 et les complexes métallo-organiques entre dans cette dernière catégorie. En effet, le champ de force ESFF^{628,629} (pour 'Extensible and Systematic Force Field') implémenté dans le logiciel Insight II⁶³⁰ de la firme Accelrys permet de traiter l'ensemble du tableau périodique et donc les espèces possédant un centre métallique comme le cuivre. Sa représentation fonctionnelle est reprise à la figure 2.1. Elle comprend classiquement les cinq contributions habituelles. Notons que différents types d'angles de valence sont considérés pour rendre compte, au mieux, de la géométrie particulière des complexes métallo-organiques.

$$\begin{aligned}
E = & \sum_b D_b \{1 - \exp[1 + \alpha(r_b - r_{b0})]\}^2 && \text{élongation des liaisons} \\
+ & \left\{ \begin{aligned} & \sum_a D_a (\cos\theta_a - \cos\theta_{a0})^2 && \text{déformation des angles de valence normale} \\ & \sum_a D_a (\cos\theta_a + 1) && \text{linéaire} \\ & \sum_a D_a (\cos\theta_a)^2 && \text{perpendiculaire} \\ & \sum_a D_a (1 - \cos\theta_a) + D_a \exp[-\beta(r - r_0)] && \text{équatoriale} \end{aligned} \right. \\
+ & \sum_\tau D_\tau [1 - s_\tau (\sin\theta'_\tau)^n (\sin\theta''_\tau)^n \cos n\tau] && \text{déformation des angles de torsion} \\
+ & \sum_o D_o \chi_o^2 && \text{déformation hors plan} \\
+ & \sum_{nb} \frac{A_{nb}}{r_{nb}^9} - \frac{B_{nb}}{r_{nb}^6} + \sum_{nb} \frac{q_1 q_2}{r_{nb}} && \text{interactions non covalentes}
\end{aligned}$$

Figure 2.1. Expression analytique du champ de forces ESFF.

L'énergie potentielle d'un système est donc une fonction complexe et multidimensionnelle des coordonnées des atomes qui le composent. La manière dont cette énergie varie avec ces coordonnées est appelée surface d'énergie potentielle. Dans la majorité des cas, on s'intéresse plus particulièrement aux états les plus stables du système, c'est-à-dire à ceux qui possèdent une énergie potentielle minimale. Tout mouvement s'écartant de ces minima donne naissance à une conformation de plus haute énergie, donc moins stable. Il est donc important, pour étudier un système, de minimiser son énergie potentielle au moyen d'algorithmes adaptés⁶³¹.

Les algorithmes utilisés dans le cadre de ce travail recherchent un minimum énergétique en se basant sur le gradient de la surface d'énergie potentielle, c'est-à-dire sur la dérivée première par rapport aux coordonnées atomiques. Le processus de minimisation est itératif et comprend deux étapes principales. Tout d'abord, l'énergie du système est évaluée en fonction de ses coordonnées, pour une conformation donnée. Ensuite, cette conformation est ajustée de façon à diminuer l'énergie du système. A chaque étape itérative, on calcule le gradient négatif de l'énergie potentielle de chaque atome par rapport à sa position relative. On déplace ensuite ces atomes le long de ce gradient négatif, jusqu'à ce que l'énergie potentielle de la conformation

passer par un minimum. Les coordonnées atomiques sont ainsi progressivement optimisées, de manière à ce que l'énergie globale de la molécule diminue le plus rapidement possible pour atteindre une conformation stable.

Une méthode simple de minimisation de l'énergie consiste donc à emprunter la direction indiquée par le gradient négatif, jusqu'au moment où la valeur de la fonction converge vers un premier minimum. A ce moment, le gradient de la fonction est recalculé et une nouvelle direction de recherche est définie. La méthode *steepest descents* adopte cette procédure qui est extrêmement efficace et fiable dans le cas de systèmes très éloignés du minimum énergétique, mais peu adaptée aux systèmes qui en sont proches. En effet, les directions de recherche de cet algorithme sont systématiquement orthogonales entre elles, ce qui peut conduire à un comportement oscillant et retarder la découverte d'un minimum énergétique. Dans de telles conditions, l'utilisation d'un second algorithme, tel que *conjugate gradients*, est conseillée. A chaque itération, cette méthode produit une direction de recherche qui tient en partie compte de celles déjà empruntées. Ceci permet une convergence plus rapide vers le minimum le plus proche (Figure 2.2.).

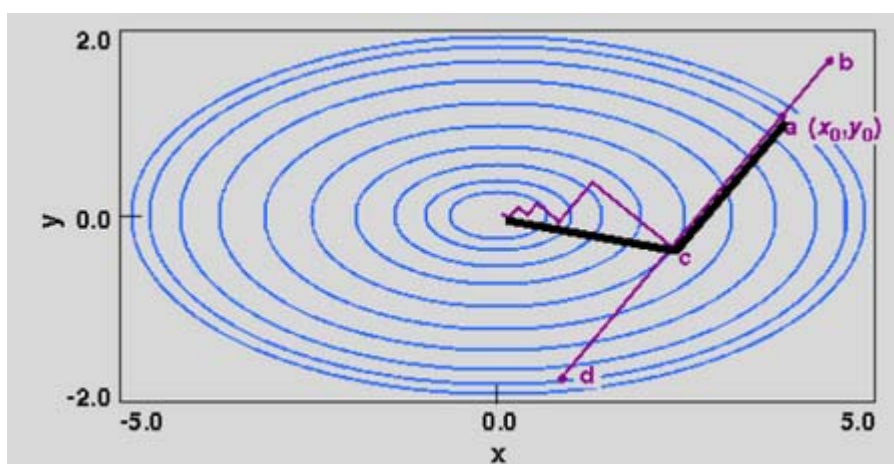


Figure 2.2. : Comparaison des deux algorithmes de minimisation utilisés. La méthode *steepest descents*, en traits fins, utilise une succession de trajectoires strictement orthogonales pouvant mener à un comportement oscillant. L'algorithme *conjugate gradient*, en traits gras, tient compte des directions de recherche déjà empruntées, ce qui permet d'atteindre plus rapidement le minimum énergétique.

Dans le cadre de ce travail, les deux algorithmes implémentés dans le module Discover3⁶²⁹ du logiciel InsightII ont été combinés afin d'étudier les conformations stables de la protéase en interaction avec les inhibiteurs métallo-organiques. Le processus débute typiquement par un traitement en *steepest descents* qui permet

d'éliminer les interactions les plus défavorables, et se poursuit par une procédure de *conjugate gradients* jusqu'à un seuil de convergence déterminé.

Pour appréhender la modélisation de systèmes de grande taille par mécanique moléculaire, plusieurs simplifications supplémentaires peuvent être envisagées.

La première est une distance de *cutoff* au-delà de laquelle les interactions entre atomes non liés ne sont plus prises en compte. En effet, ces interactions diminuent rapidement avec la distance, suivant le rapport $1/r$ pour les forces électrostatiques et $1/r^6$ pour les forces de van der Waals. On peut donc considérer que ces contributions sont négligeables, passé un certain seuil. Afin d'éviter des discontinuités dans l'évaluation de l'énergie, les interactions non nulles à cette distance sont progressivement supprimées grâce à une fonction modératrice s'appliquant à une zone tampon intermédiaire. Cette fonction, illustrée à la figure 2.3., est définie par les distances *cutdis* et *swdis*. La séparation de dipôles de part et d'autre de la distance de *cutoff* pourrait également mener à des discontinuités de l'énergie. Pour y remédier, on peut considérer le système moléculaire comme un ensemble de groupes de charges, inséparables sous l'action du *cutoff*. La charge du groupe est alors portée par un seul atome central.

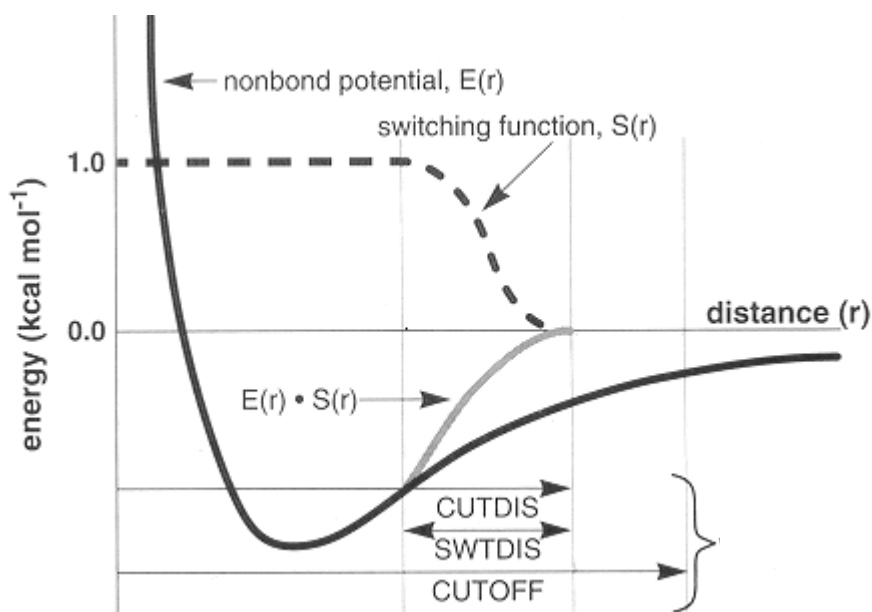


Figure 2.3. Effet de l'application d'une fonction modératrice $S(r)$ au potentiel d'interaction entre atomes non liés $E(r)$. L'énergie résultante est égale au produit $E(r) \cdot S(r)$. Les paramètres *cutoff*, *cutdis*, *swtdis* modulent cette fonction.

Une deuxième simplification consiste à fixer la position de certains atomes. Ainsi, le champ de forces ESFF que nous avons utilisé, a été conçu pour traiter l'ensemble du tableau périodique et permet donc de modéliser les complexes métallo-organiques⁶²⁸. Il n'a cependant été que très peu testé sur des systèmes protéiques^{632,633}. Dès lors, il a paru plus prudent de ne laisser bouger que progressivement les résidus formant le site actif de l'enzyme et les inhibiteurs métallo-organiques lors des différentes minimisations d'énergie, le reste de la protéase étant figé dans sa structure cristalline.

Enfin, la constante diélectrique reflète le milieu dans lequel le système évolue. Dans un milieu hydrophobe, comme au cœur d'une protéine, la constante diélectrique est de l'ordre de 4, alors que dans l'eau elle atteint 80. Dans d'autres milieux, des valeurs intermédiaires sont d'application. Une constante diélectrique dépendant de la distance a été utilisée ici, comme il est généralement d'usage dans les études de modélisation de protéines.

2.3 La méthode SIBFA, particulièrement adaptée à l'étude des espèces métalliques

La mécanique moléculaire est une technique de choix pour modéliser l'interaction entre un inhibiteur et sa protéine cible. Certains champs de forces, comme par exemple ESFF, sont en outre paramétrés pour prendre en compte les spécificités géométriques des métaux⁶³⁴⁻⁶³⁹ et permettre de reproduire correctement la structure de la plupart des complexes métallo-organiques.

Cependant, leur efficacité est limitée lorsqu'il s'agit d'étudier des phénomènes énergétiques plus fins tels que la détermination de propriétés électroniques. En l'occurrence, le processus de complexation implique la désolvatation de l'ion métallique et des ligands, des effets électroniques lors de la liaison entre le métal et l'atome chélatant, des effets stériques dépendant de la préorganisation du ligand et de la taille du cation métallique, des termes entropiques attribués, entre autres, à l'effet chélate, etc..., la stabilité du complexe formé dépendant de l'ensemble de ces propriétés⁶³⁷. Il est dès lors indispensable de se tourner vers une technique de modélisation alliant une description très précise de l'énergie du système étudié à un temps de calcul raisonnable.

Dans cette optique, les champs de forces polarisables apportent un réel progrès à la description énergétique d'un système par mécanique moléculaire⁶⁴⁰. Contrairement aux champs de forces classiques qui utilisent des charges fixes centrées sur les atomes, les champs de forces polarisables sont caractérisés par une variation de la distribution de charges en fonction de leur environnement. Ce type de modélisation permet, entre autres, de rendre mieux compte des effets diélectriques du solvant.

Parmi les méthodes tenant compte de la polarisation, SIBFA (pour '*Sum of Interactions Between Fragments Ab initio computed*') permet de modéliser aussi bien des systèmes peptidiques ou protéiques⁶⁴¹⁻⁶⁴⁶ que des systèmes incluant des espèces métalliques telles que le zinc (II)^{643,647-653}, le cuivre (I)⁶⁵⁴, le magnésium (II), le calcium (II) et le cadmium (II)^{647,655,656}. Cette méthode de mécanique moléculaire a l'avantage de reproduire précisément les énergies observées en mécanique quantique, tout en conservant une rapidité de calcul remarquable. Par exemple, un calcul ponctuel sur un complexe métallique comportant une vingtaine d'atomes prend environ une seconde en SIBFA. Il reproduit cependant, avec moins de 3% d'erreur, l'énergie

obtenue après 7 heures de calcul en mécanique quantique de haut niveau incluant de la corrélation électronique^{657*}.

En outre, l'approximation du 'rotor rigide' permet de réduire le nombre de variables prises en compte lors des minimisations qui pourront ainsi être réalisées dans des délais raisonnables. En effet, les champs de forces classiques décrivent l'énergie potentielle d'un système par une somme de termes reprenant notamment l'élongation des liaisons et la déformation des angles de valence. Ces derniers sont généralement qualifiés de 'termes durs' car il suffit de s'éloigner de quelques dixièmes d'ångström ou de quelques degrés de la position d'équilibre pour que l'énergie potentielle augmente considérablement⁶²⁶. Dès lors, on peut considérer qu'ils ne varieront presque pas au cours d'une simulation, et qu'ils peuvent donc être fixés dans leur position d'équilibre. C'est ainsi que SIBFA considère les molécules comme un ensemble de fragments rigides indépendants, bougeant les uns par rapport aux autres.

La méthode SIBFA définit l'énergie d'interaction intermoléculaire (ou interfragmentales) par une somme de cinq contributions^{653,658} (Pour une description détaillée de celles-ci, voir la référence⁶²⁶ p148-173):

$$\Delta E_{\text{int}} = E_{\text{MTP}} + E_{\text{rep}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{ct}} + E_{\text{disp}}$$

- Le terme **électrostatique**, E_{MTP} , peut être considéré comme une expansion multipolaire et correspond à la somme des interactions entre multipôles (interactions entre charges, dipôles et quadripôles). Ceux-ci sont distribués sur les atomes et sur les barycentres des liaisons des molécules ou des fragments moléculaires constituant le système. Ils sont obtenus à partir de l'évaluation par mécanique quantique (procédure SCF) de la fonction d'onde moléculaire selon une méthode développée par Vigné-Maeder et Claverie⁶⁵⁹.

- Le terme **répulsif**, E_{rep} , permet d'évaluer l'énergie de répulsion à courte distance. Il est calculé à partir de la somme des interactions liaison/liaison, liaison/paire libre et paire libre/paire libre plutôt qu'à partir des interactions entre atomes pour tenir compte de son caractère anisotropique. La formulation de E_{rep} inclut la considération explicite de la directionnalité des paires libres, ainsi qu'une adaptation de la distance interatomique en fonction de l'orientation des liaisons^{653,660}.

* La corrélation électronique tient compte du fait que deux électrons de spin opposés ne peuvent se trouver simultanément au même endroit de l'espace. Cette corrélation électronique n'est pas prise en compte dans un calcul de type Hartree-Fock classique.

- Le terme de **polarisation**, E_{pol} , est calculé à partir des polarisabilités anisotropiques, distribuées sur les paires libres et les barycentres des liaisons des fragments moléculaires individuels, selon la procédure de Garmer et Stevens⁶⁶¹. La distribution des charges et des multipôles sur les différents fragments n'est en effet pas statique. Charges et multipôles s'influencent mutuellement causant ce qu'on appelle un champ de polarisation. La méthode SIBFA est basée sur le modèle du dipôle ponctuel induit⁶⁴⁰. Ce modèle considère qu'un dipôle ponctuel, μ_{ind} , est induit sur chaque centre P impliqué dans la simulation par le champ électrique total E_P , c'est-à-dire le champ dû aux charges et multipôles permanents additionné du champ dû aux autres dipôles induits, suivant la relation:

$$\mu_{\text{P}}^{\text{ind}}(i) = \alpha_{\text{P}}(i,j) E_{\text{P}}(j)$$

avec $\alpha_{\text{P}}(i,j)$, le tenseur de polarisabilité des composants i et j sur le centre P. Le champ total E_P est déterminé de manière autocohérente par une procédure itérative qui minimise l'énergie de polarisation. En considérant E_0 comme étant le champ du aux seuls dipôles permanents, cette dernière peut être écrite sous la forme suivante^{660,662}:

$$E_{\text{pol}}(P) = -0.5 \sum_i E_0(i) \sum_j \mu_{\text{P}}^{\text{ind}}(i)$$

Les multipôles et les polarisabilités distribués sur chaque fragment sont obtenus par mécanique quantique.

- Le terme de **transfert de charge**, E_{ct} , est proportionnel au recouvrement entre les doublets libres du donneur et de l'accepteur d'électron. On peut observer à ce niveau un couplage avec la polarisation. En effet, le dénominateur de E_{ct} prend en compte le potentiel d'ionisation du donneur d'électron et l'électroaffinité de l'accepteur d'électron : le potentiel d'ionisation est augmenté par le potentiel électrostatique positif exercé par les autres molécules du système sur cet atome, tandis l'électroaffinité est diminuée par le potentiel électrostatique négatif dû aux ligands voisins⁶⁶⁰.

- Le terme de **dispersion**, E_{disp} , rend compte des forces de London, décrivant l'interaction entre dipôles instantanés à longue distance. Il est exprimé sous la forme d'une somme de termes variant en r^{-6} , r^{-8} et r^{-10} . A courte distance, ces termes sont ajustés par une fonction exponentielle d'amortissement. La description du phénomène d'échange-répulsion* est explicitement incluse dans E_{disp} et permet de prendre en compte les interactions mutuelles entre les divers fragments.

* Le phénomène d'échange-répulsion est une conséquence du principe d'exclusion de Pauli affirmant que deux électrons de même spin ne peuvent occuper une même région de l'espace. En réduisant la densité électronique au niveau des liaisons, on diminue l'écrantage des charges positives localisées sur

Nous avons vu que la méthode SIBFA considère les molécules flexibles comme un assemblage de fragments moléculaires rigides. Ces fragments peuvent subir des rotations les uns par rapport aux autres, ce qui confère une flexibilité à la molécule qu'ils constituent. L'énergie intramoléculaire ΔE_{intra} qui en découle correspond en fait à l'énergie intermoléculaire entre les fragments constitutifs et est dès lors formulée de la même manière que ΔE_{int} . ΔE_{intra} possède cependant une contribution supplémentaire E_{tor} décrivant l'énergie de déformation des angles de torsion. Des barrières énergétiques de rotation sont fixées pour chaque pseudo-liaison entre fragments à partir de calculs conformationnels obtenus par mécanique quantique sur des petites molécules comme l'éthane ou l'éther diméthylque⁶⁶³.

Pour permettre une compatibilité entre les énergies inter et intramoléculaire et tenir compte du caractère non additif des termes de polarisation et de transfert de charge, différentes adaptations sont nécessaires⁶⁴³. Pour calculer E_{MTP} , les multipôles sont distribués comme d'habitude sur les jonctions entre fragments. Par contre, dans l'évaluation de E_{pol} , les multipôles attribués à ces jonctions ne sont pas redistribués. On considère ainsi que les atomes d'hydrogène impliqués dans ces liaisons entre fragments sont repliés sur les atomes de carbone, d'azote ou d'oxygène auxquels ils sont liés. Cette procédure permet d'éviter que les fragments acquièrent une charge fractionnelle au cours de la redistribution des multipôles et que les atomes d'hydrogène impliqués dans la jonction se trouvent à une distance trop faible d'un centre polarisable appartenant à un fragment adjacent^{648,649}.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la méthode SIBFA pour étudier les propriétés énergétiques des complexes **C1**, **C2**, et leurs dérivés. Les ligands correspondants ont été construits à partir des fragments suivants (Figure 2.4.): pour **L1**, des molécules de benzène (fragment 1), de formamide (fragment 2), de pyridine (fragment 3), d'eau (fragments 4, 6 et 8) et de méthane (fragments 5, 7 et 9) ; et pour **L2**, des molécules de benzène (fragment 1), de méthane (fragments 2 et 6), de formamide (fragment 3), de quinoléine (fragment 4) et d'eau (fragment 5)⁶⁶⁴.

Les énergies d'interaction intermoléculaires entre les ligands et le cuivre (II) ont été calculées comme faisant partie d'une interaction 'intramoléculaire' globale tenant compte des variations conformationnelles subies par chaque ligand flexible. L'énergie de complexation est évaluée en faisant la différence entre, d'une part, l'énergie 'intramoléculaire' globale du complexe constitué par le cuivre (II) et ses ligands, et d'autre part, la somme des énergies intramoléculaires des ligands flexibles optimisés

les noyaux impliqués dans la liaison. Ceux-ci subissent dès lors une répulsion mutuelle supplémentaire.

dans leur conformation stable avant d'être complexés. Les minimisations d'énergie ont été réalisées à l'aide du logiciel Merlin⁶⁶⁵⁻⁶⁶⁷. Nous avons choisi l'algorithme de minimisation 'roll', basé sur une méthode directe n'utilisant pas de gradient, car il est bien adapté aux systèmes de la taille des complexes que nous étudions.

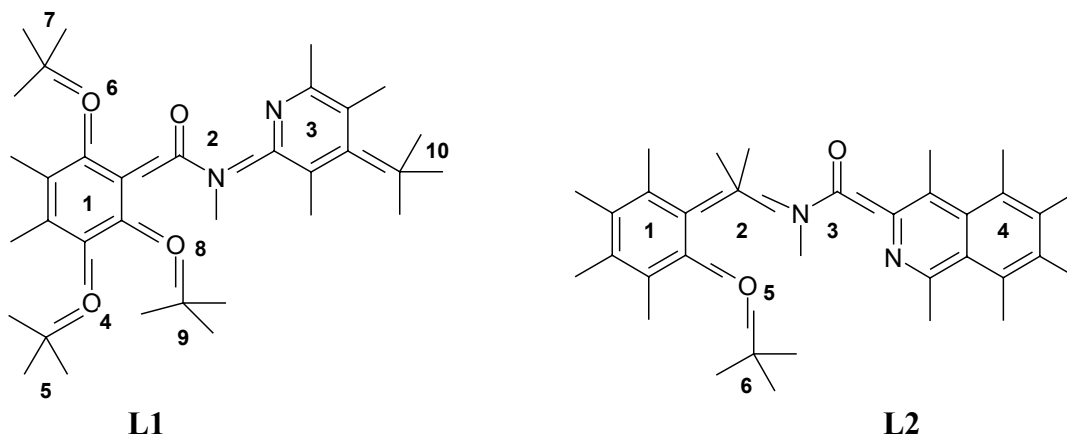


Figure 2.4. Fragments constitutifs des ligands **L1** et **L2**. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène et de carbone ne sont pas représentés par leur symbole atomique.

Pour comparer les stabilités relatives des complexes formés, ce calcul a été complété par des effets de solvation du complexe, de l'ion cuivrique et des ligands isolés. L'énergie de **solvation**, E_{solv} , est évaluée suivant la procédure développée par Langlet⁶⁶⁸ et implémentée dans SIBFA. Celle-ci modélise le solvant au moyen d'un champ continu : les molécules de soluté sont représentées sous la forme d'une distribution de charges placées à l'intérieur d'une cavité. Cette cavité est elle-même entourée par un milieu continu représentant le solvant qui est caractérisé par des propriétés macroscopiques telles que la constante diélectrique, le volume moléculaire, le coefficient d'expansion thermique, etc... Tout comme lors de l'évaluation de ΔE_{int} , E_{solv} est calculé à partir de cinq contributions : un terme électrostatique, E_{MTP} , un terme de répulsion, E_{rep} , un terme de polarisation, E_{pol} , un terme de dispersion, E_{disp} , et un terme de cavitation E_{cav} qui tient compte de l'énergie requise pour former une cavité de soluté dans le solvant.

$$E_{\text{solv}} = E_{\text{MTP}} + E_{\text{rep}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{disp}} + E_{\text{cav}}$$

Les énergies électrostatique et de polarisation sont calculées à partir de la distribution des multipôles établie par SIBFA, afin d'assurer une compatibilité entre les énergies ΔE_{int} et E_{solv} .

1. Caractérisation structurale de complexes au cuivre(II) à l'état cristallin. Hypothèses d'interaction avec la protéase du VIH-1.

Comme nous l'avons vu dans le troisième chapitre de l'introduction générale, cette thèse se situe dans la continuité de travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire⁶⁶⁹. Ils ont permis de pointer les potentialités des complexes métallo-organiques en tant qu'inhibiteurs de la protéase du VIH-1. En effet, l'optimisation du composé chef de file SETCEZ a débouché sur l'identification d'une famille originale de complexes au cuivre (II) possédant, pour certains, une activité inhibitrice intéressante (voir le tableau 3.1., p. 72). Cependant, si on se base sur un mode de complexation semblable à celui de SETCEZ, il est *a priori* difficile d'expliquer l'activité de ces inhibiteurs.

Une caractérisation structurale de ces complexes métallo-organiques est dès lors indispensable. Ce premier chapitre est consacré, dans un premier temps, à l'analyse cristallographique des complexes **C0-C4**. Nous verrons ensuite, à l'aide d'une étude de modélisation en mécanique moléculaire, que les données structurales à l'état cristallin permettent de poser de premières hypothèses d'interaction entre ces complexes et la protéase du VIH-1.

1.1. La structure des complexes C0-C4 à l'état cristallin, point de départ de l'interprétation des données d'activité anti-enzymatique

... le cristal, lieu d'interactions moléculaires

La détermination d'une structure à l'état cristallin par diffraction des rayons X donne accès non seulement à une conformation moléculaire mais également aux interactions que cette molécule forme au sein du cristal. Une étude détaillée de celles-ci est souvent utile, car elle permet de pointer des interactions qui pourront se reproduire dans un autre environnement, comme par exemple au sein du site actif d'une protéine.

Ce premier paragraphe est consacré à une description rapide des différentes interactions intermoléculaires⁶²⁶ que l'on peut retrouver aussi bien dans un milieu cristallin, que dans un système macromoléculaire comme celui formé par une protéine et son ligand. Notons que la classification présentée ici n'est pas absolue et que les interactions entre molécules résultent souvent d'une combinaison de différentes contributions.

Les **interactions électrostatiques** sont des forces d'attraction à relativement longue distance entre deux charges opposées. On retrouve ainsi les interactions ioniques entre deux charges nettes, les interactions entre une charge et un dipôle, et les interactions entre dipôles (ou multipôles^{*}). Le **pont hydrogène**⁶⁷⁰ est une interaction électrostatique directionnelle entre un donneur X et un accepteur A de proton, le proton portant une charge partielle positive et l'accepteur une charge partielle négative.

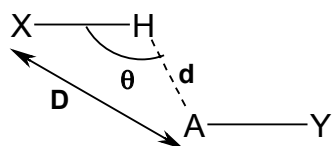


Figure 1.1. Paramètres géométriques d'un pont H.

Les ponts H sont généralement caractérisés par trois paramètres géométriques : D, d, et θ représentant respectivement la distance entre le donneur et l'accepteur, la distance entre le proton et l'accepteur et l'angle formé par les trois partenaires (Figure 1.1.). En fonction de ces critères et de la nature chimique des partenaires, on peut évaluer la valeur énergétique et donc la force de cette interaction (Tableau 1.1.).

* On peut ainsi relever les interactions charge-quadripôle, dipôle-quadripôle, quadripôle-quadripôle, etc...

Tableau 1.1 Caractéristiques des ponts H suivant leur force⁶⁷⁰.

	Très fort	Fort	Faible
Energie de liaison [-kcal/mol]	15-40	4-15	<4
Nature des partenaires (exemples)	P-OH---O=	OH---O=	CH---O=
D [Å]	2.2-2.5	2.5-3.2	3.0-4.0
d [Å]	1.2-1.5	1.5-2.2	2.0-3.0
θ [°]	175-180	130-180	90-180

Les **interactions non polaires** regroupent les **interactions hydrophobes** et les **interactions de van der Waals**. En effet, les groupes apolaires ont tendance à se regrouper entre eux pour exclure les molécules d'eau, donnant naissance aux interactions hydrophobes qui sont essentiellement de nature entropique. Les interactions de van der Waals sont des forces d'attraction agissant à courte portée. Ces interactions faibles mais additives sont représentées par le terme attractif du potentiel de Lennard-Jones.

Les **interactions de type π - π** ⁶⁷¹⁻⁶⁷⁶ sont particulièrement importantes dans la reconnaissance moléculaire, que ce soit au sein d'un système biologique ou d'un édifice cristallin. Elles concernent spécialement les interactions entre cycles aromatiques dues principalement aux contributions des forces de van der Waals et des forces hydrophobes. C'est cependant la contribution électrostatique qui détermine la géométrie de l'interaction. Le système π est en effet caractérisé par un moment quadripolaire que l'on peut représenter, dans le cas du benzène, comme une charge positive localisée au niveau du plan du cycle aromatique et entourée de deux nuages électroniques chargés négativement. Lorsque deux quadripôles entrent en interaction, plusieurs géométries sont envisageables (Figure 1.2.).

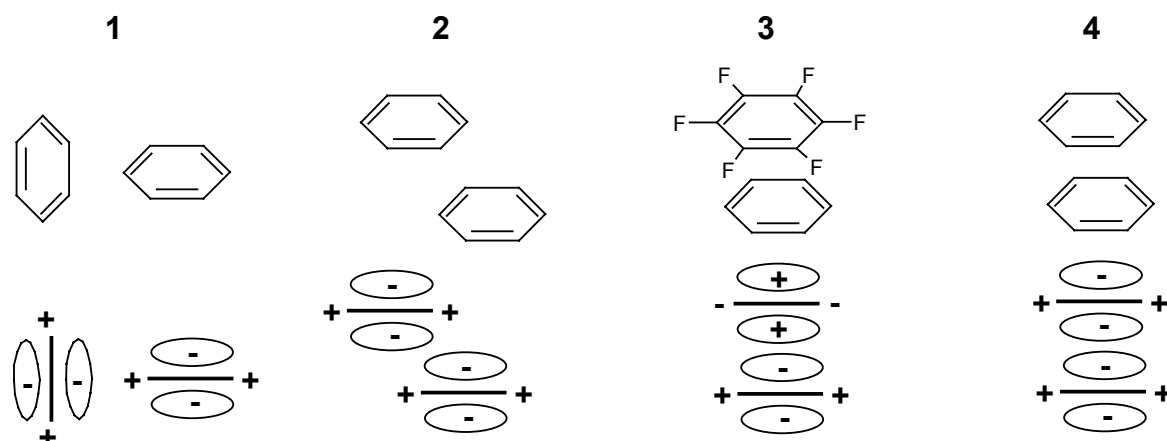


Figure 1.2. Interactions π - π entre cycles aromatiques. Les configurations géométriques perpendiculaire ou C-H... π en **1**, parallèle décalée en **2** et parallèle en **3** sont favorables. La configuration parallèle en **4** est défavorable.

Certaines configurations géométriques favorisent les interactions électrostatiques (Figure 1.2., géométries **1**, **2** et **3**) tandis que d'autres provoquent une répulsion entre les nuages électroniques (Figure 1.2, géométrie **4**). Le type de configuration dépend, de plus, des substituants portés par les cycles aromatiques en interaction, comme on peut le voir lorsque l'on compare l'interaction **2** benzène/benzène et l'interaction **3** benzène/hexafluorobenzène.

Dans le cas d'une interaction entre cycles benzéniques, on observe des contacts π - π parallèles décalés ou perpendiculaires. Dans la géométrie π - π décalée, la distance entre les plans est comprise entre 3.3 et 3.6 Å, le décalage latéral entre le centre des cycles varie entre 3 et 4 Å tandis que la distance entre ces centroïdes est optimale entre 3.5 et 4.5 Å. Dans la géométrie π - π perpendiculaire, on estime que la distance la plus stable entre centroïdes vaut 5-6 Å⁶⁷⁷.

... structure cristallographique des complexes **C01** et **C02**⁶⁷⁸

Nous avons vu dans le chapitre 3 de l'introduction générale que le ligand **L0** est très semblable à celui du composé chef de file SETCEZ⁴⁸⁹. Il ne possède cependant qu'une seule fonction carbonyle, qui devrait suffire à l'interaction avec la protéase (Figure 1.3.). Deux sels de cuivre (II) différents, du $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ et du $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ suivi d'un excès de KPF_6 ont été utilisés pour complexer **L0** ; ils ont donné respectivement les complexes **C01** et **C02** dont nous présentons ici la caractérisation structurale par DRX.

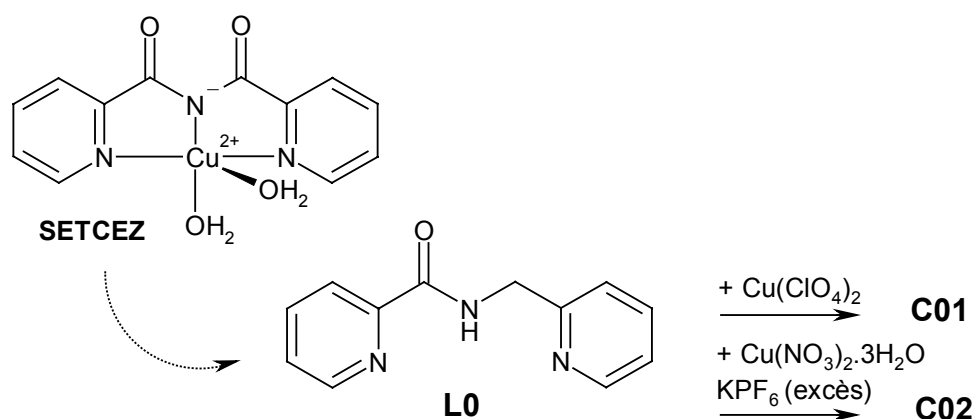


Figure 1.3. Le ligand **L0** est très semblable à celui de SETCEZ. Il forme avec l'ion cuivrique les complexes **C01** et **C02**.

Les monocristaux du complexe **C01** ont été obtenus par évaporation lente et à température ambiante d'une solution du composé dans un mélange 1:1 d'éthanol et de méthanol. Ces cristaux sont stables à l'air libre et présentent une couleur bleue typique des complexes au cuivre (II). Dans ces conditions, **C01** cristallise dans le système triclinique *P*-1. Les paramètres de maille et l'indice de désaccord liés à cette structure sont résumés à la figure 1.4. tandis qu'une liste détaillée des données cristallographiques est reprise en annexe. La structure cristallographique de **C01** a été déposée dans la banque de données structurales de Cambridge (CSD) sous le nom de code XOSNOI.

La structure cristallographique de **C01** est représentée schématiquement à la figure 1.4.

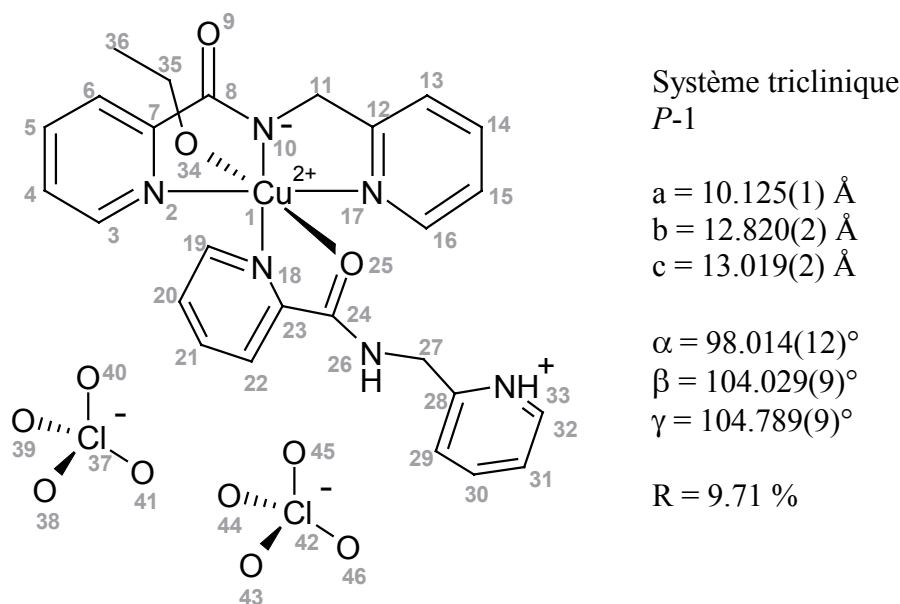


Figure 1.4. Représentation schématisée de la structure cristallographique du complexe **C01** ainsi que ses paramètres de maille. Le complexe porte une charge globale +2 neutralisée par deux ions perchlorate.

Contrairement au complexe SETCEZ formé par l'interaction d'un seul ligand organique avec l'ion cuivrique, deux ligands **L0** s'organisent autour de Cu^{2+} en un complexe octaédrique déformé tétraгонаlement. Le plan équatorial de l'octaèdre est défini par les trois atomes d'azote [deux azotes pyridiniques N(2) et N(17) et l'azote déprotoné de l'amide N(10)] d'un premier ligand tridentate adoptant avec l'ion cuivrique un mode de complexation similaire à celui de SETCEZ, et par l'azote pyridinique N(18) du second ligand. L'oxygène amidique O(25) de ce second ligand bidentate occupe, quant à lui, une des positions apicales de l'octaèdre. Enfin, l'oxygène O(34) d'une molécule d'éthanol issue du solvant assure la deuxième coordination axiale. Les quatre liaisons dans le plan équatorial sont courtes ($\sim 2.0 \text{ \AA}$), alors que les deux liaisons apicales, de part et d'autre du plan, sont plus longues ($\sim 2.4 \text{ \AA}$) (Tableau 1.2.). L'azote de la pyridine libre du ligand bidentate est protoné, ce qui confère au complexe une charge globale +2. Deux ions perchlorate libres assurent la neutralité du cristal.

Tableau 1.2. Longueur des liaisons reliant l'ion cuivrique aux différents atomes chélatant de **C01**. Les esd sont repris entre parenthèses. Les liaisons plus longues déterminant les positions axiales sont en grisé.

Cu(1)---	---N(2)	---N(17)	---N(10)	---N(18)	---O(25)	---O(34)
distance [\AA]	2.024(8)	2.016(8)	1.921(9)	2.020(9)	2.462(8)	2.427(8)

Bien que **C01** présente une géométrie octaédrique, les angles de valence observés autour du centre métallique s'éloignent parfois des valeurs idéales de 90 et 180 degrés. On note ainsi des déviations allant jusqu'à 15 degrés qui sont reprises en grisé dans le tableau 1.3. La tension engendrée par la formation de trois cycles à cinq chaînons lors de la chélation peut expliquer ces écarts par rapport à l'idéalité. On observe, en outre, que l'ion cuivrique s'écarte de 0.094 Å du plan équatorial moyen formé par les azotes N(2), N(10), N(17) et N(18).

Tableau 1.3. Angles de valence formés autour de l'ion cuivrique dans **C01**. Les esd sont repris entre parenthèses. Les écarts les plus importants aux valeurs idéales de 90 et 180 degrés sont repris en grisé.

Angles (atomes)	Angles [°]	Angles (atomes)	Angles [°]
N(2)-Cu(1)-N(17)	164.0(4)	O(25)-Cu(1)-N(2)	95.5(3)
N(10)-Cu(1)-N(18)	171.7(3)	O(25)-Cu(1)-N(10)	97.4(3)
O(25)-Cu(1)-O(34)	164.9(3)	O(25)-Cu(1)-N(17)	85.6(3)
		O(25)-Cu(1)-N(18)	75.0(3)
N(2)-Cu(1)-N(18)	95.8(3)	O(34)-Cu(1)-N(2)	93.0(3)
N(18)-Cu(1)-N(17)	99.8(4)	O(34)-Cu(1)-N(10)	96.4(3)
N(17)-Cu(1)-N(10)	82.6(4)	O(34)-Cu(1)-N(17)	90.1(3)
N(10)-Cu(1)-N(2)	81.5(3)	O(34)-Cu(1)-N(18)	91.6(3)

Différentes interactions intra et intermoléculaires peuvent être relevées et sont reprises respectivement dans les tableaux 1.4. et 1.5. Ainsi, le cycle pyridinique IV du ligand bidentate s'oriente de manière à effectuer une interaction intramoléculaire de type π - π parallèle avec le cycle pyridinique II du ligand tridentate. Une autre interaction π - π intramoléculaire peut être observée entre la pyridine III du ligand bidentate et cycle pyridinique I du ligand tridentate (Figure 1.5.).

Tableau 1.4. Interactions intramoléculaires au sein de la structure cristalline de **C01**. Elles sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes et par une distance 2* et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle dièdre [°]
π - π parallèle	cycles II-IV	4.2	3.8	16
π - π perpend.	cycles I-III	5.1	-	82

* Distance interplan, normale au plan du deuxième cycle.

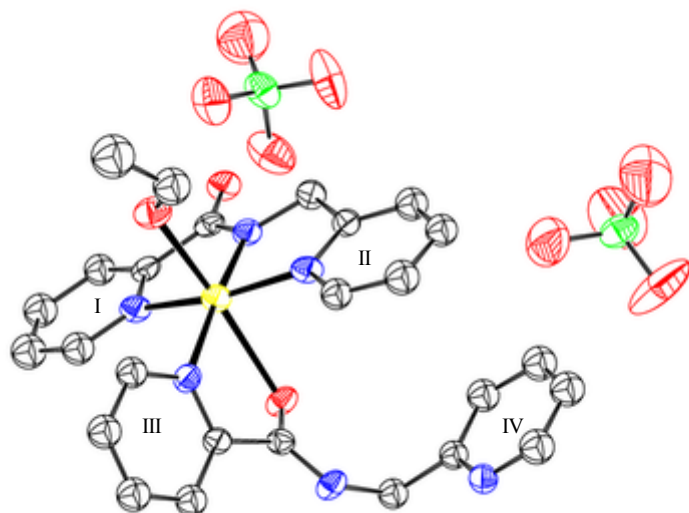


Figure 1.5.
Conformation moléculaire de **C01-XOSNOI** à l'état cristallin. Comme 60% des données collectées étaient faibles, seuls les hétéroatomes ont été traités anisotropiquement (les ellipsoïdes de vibration sont représentées avec une probabilité de 30%). Les hydrogènes ne sont pas repris pour ne pas nuire à la clarté de la figure.

La cohésion cristalline est assurée par deux types d'interactions intermoléculaires (Figure 1.6.). D'une part, deux ponts hydrogène intermoléculaires relient l'oxygène de l'amide du ligand tridentate avec l'azote amidique protoné et avec l'azote pyridinique protoné du ligand bidentate d'une autre molécule. D'autre part, une série d'interactions de type π - π se produisent entre cycles pyridiniques de complexes voisins. On peut observer que les cycles impliqués dans les contacts π - π se trouvent typiquement dans une géométrie 'parallèle décalée' ou 'perpendiculaire' permettant une interaction attractive favorable.

Tableau 1.5. Interactions intermoléculaires au sein de la structure cristalline de **C01** (symétrie #1 : -1+x,y,z ; symétrie #2 : -x,-y,1-z). Les ponts hydrogène formés entre accepteurs A et donneurs de proton D-H sont caractérisés par une distance 1 D-A, une distance 2 H...A et un angle D-H...A. Les interactions π - π sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes, et par une distance 2 et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle [°]
pont H	N(26)-H(26)...O(9) ^{#1}	3.017(13)	2.4	128
	N(33)-H(33)...O(9) ^{#1}	2.688(12)	1.9	165
π - π parallèle	cycles I-IV ^{#2}	4.1	3.9	14
	cycles II-II ^{#2}	4.3	3.4	0
π - π perpend.	cycles I-III ^{#1}	5.9	-	82

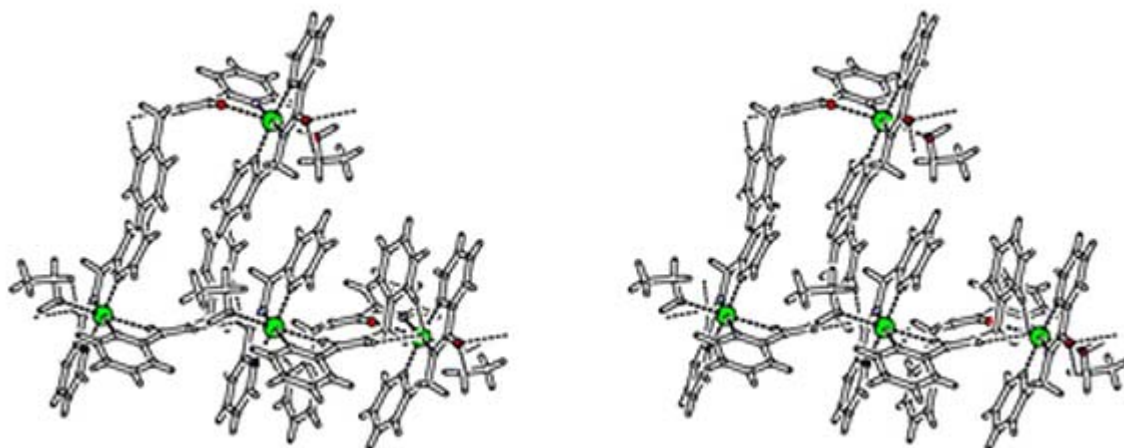


Figure 1.6. Vue stéréoscopique de l'empilement cristallin du complexe **C01-XOSNOI**. On observe deux ponts hydrogène ainsi que toute une série d'interaction π - π intermoléculaires.

Notons ici qu'un autre essai de cristallisation de **C01** a été réalisé par évaporation lente après solubilisation de l'échantillon dans de l'eau chaude. Dans ces conditions, **C01** cristallise dans le système monoclinique $P2_1/n$ avec un indice de désaccord final de 7.57%. Cette nouvelle structure a été déposée dans CSD sous le nom de code XOSNUO. Les données cristallographiques relatives à **C01-XOSNUO** se trouvent en annexe.

La structure générale de **C01-XOSNUO** est quasi identique à celle de **C01-XOSNOI** (Figure 1.8.). La différence majeure réside dans le fait qu'on n'observe pas de molécule d'éthanol en position apicale. Le complexe est dès lors caractérisé par cinq coordinations au lieu de six.

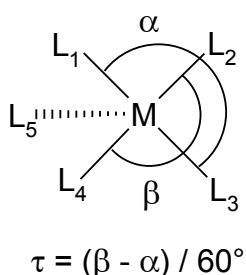


Figure 1.7. Relations angulaires définissant τ .

On peut distinguer deux types de géométrie en fonction des angles formés autour du cuivre et quantifiés par la valeur τ (Figure 1.7.). Une valeur de τ nulle caractérise une géométrie de type pyramidale à base carrée parfaite, tandis qu'une valeur de τ proche de l'unité correspond à une géométrie bipyramidale triangulaire⁶⁷⁹. XOSNUO adopte ici une géométrie pyramidale à base carrée ($\tau = 0.11$), le plan équatorial étant formé par les trois atomes d'azote du ligand tridentate et par l'azote pyridinique du ligand bidentate. Tout comme pour **C01-XOSNOI**, on retrouve l'oxygène amidique du ligand bidentate en position apicale.

En face de cet oxygène, mais à une distance trop importante pour former une liaison avec le cuivre ($> 2.6 \text{ \AA}$), on observe un des deux ions perchlorates. Deux molécules d'eau issues du solvant sont en outre présentes dans l'unité asymétrique du cristal.

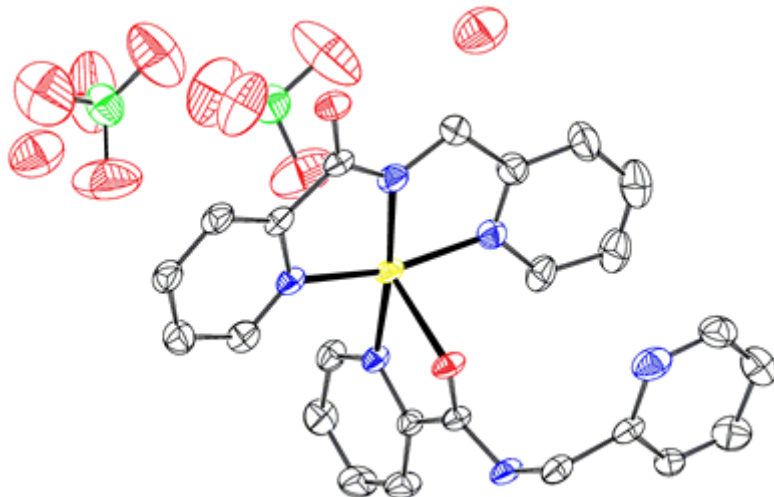


Figure 1.8. :
Conformation moléculaire de **C01-XOSNUO** à l'état cristallin. Pour plus de clarté, les hydrogènes ne sont pas repris. Les ellipsoïdes de vibration sont représentés avec une probabilité de 30%.

On peut relever ici aussi le même type d'interactions intra et intermoléculaires : différents contacts π - π parallèles et perpendiculaires se forment entre les cycles pyridiniques et deux ponts hydrogène intermoléculaires peuvent être relevés entre l'oxygène amidique du ligand tridentate et l'azote amidique protoné du ligand bidentate.

La structure de **C02** a également été déterminée par DRX. Des monocristaux de **C02** ont été obtenus par évaporation lente à température ambiante après la solubilisation de l'échantillon dans de l'eau distillée. Les cristaux bleus observés sont stables à l'air libre. Ils cristallisent dans le système monoclinique et sont caractérisés par un groupe spatial $P2_1/a$. La structure cristallographique de **C02** a été déposée dans CSD sous le nom de code XOSPAW. Les paramètres de maille ainsi que la structure sont repris à la figure 1.9.

Bien qu'il soit formé à partir des même ligands, le mode de complexation de **C02** est tout à fait différent de celui de **C01**. La structure cristallographique de **C02** présente une symétrie axiale C_2 , définie par l'axe Cu(1)-O(18). Deux ligands bidentates symétriques s'organisent autour de l'ion cuivrique, formant avec une molécule d'eau issue du solvant un complexe à 5 coordinations. Ce complexe adopte une géométrie de type pyramidal à base carrée, comme en témoigne la valeur de τ de 0.24. Le plan équatorial du complexe est défini par l'oxygène amidique O(9)-O(9)^{#1} et

l'azote pyridinique N(2)-N(2)^{#1} de chacun des deux ligands organiques. Ils forment avec l'ion cuivrique des cycles à cinq chaînons caractérisés par un angle de chélation de 82.43° et des liaisons métal/ligand courtes (Tableau 1.6.). Le cuivre s'écarte du plan équatorial de 0.161 Å. Les angles de valence observés autour du centre métallique sont repris dans le tableau 1.7. Enfin l'oxygène O(18) d'une molécule d'eau occupe l'unique position axiale et forme avec le cuivre une liaison plus longue.

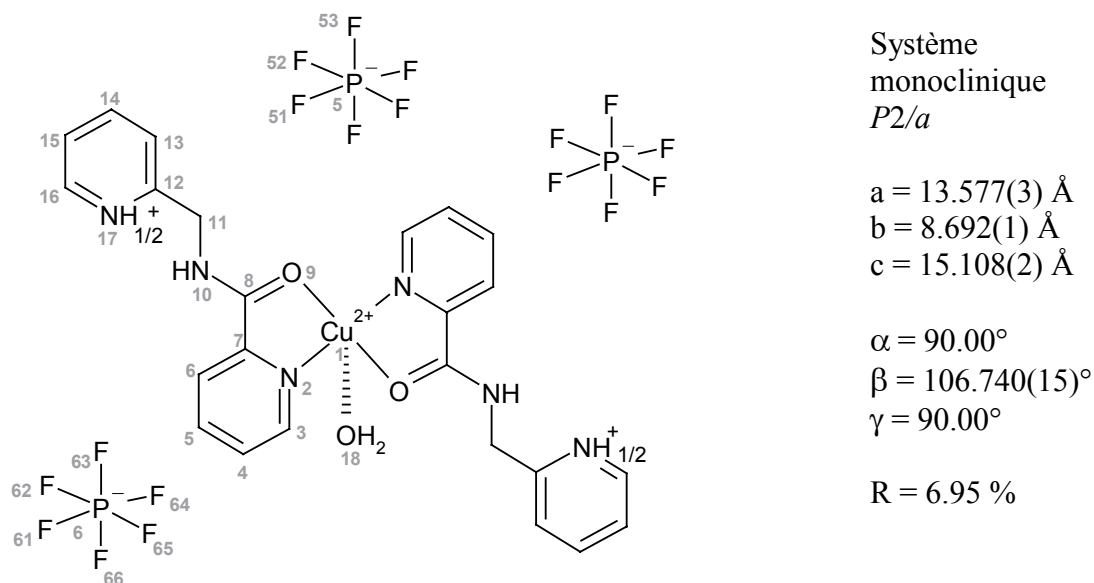


Figure 1.9. Représentation schématique de la structure cristallographique du complexe **C02** ainsi que ses paramètres de maille. Le complexe porte une charge globale +3 neutralisée par trois ions PF_6^- .

L'azote N(17) du cycle pyridinique est protoné une fois sur deux, ce qui explique la présence d'un ion et demi de PF_6^- libre au sein de l'unité asymétrique, assurant ainsi la neutralité du cristal.

Tableau 1.6. Longueur des liaisons reliant l'ion cuivrique aux différents atomes chélatants de **C02**.

Cu(1)---	---N(2)	---O(9)	---O(18)
distance [Å]	1.970(3)	1.973(2)	2.234(5)

Tableau 1.7. Angles de valence formés autour de l'ion cuivrique dans **C02**. La symétrie #1 vaut : $-x+3/2, y, -z+1$.

Angles (atomes)	Angles [°]	Angles (atomes)	Angles [°]
N(2)-Cu(1)-N(2) ^{#1}	178.0(2)	N(2)-Cu(1)-O(18)	91.00(9)
O(9)-Cu(1)-O(9) ^{#1}	163.5(2)	N(2) ^{#1} -Cu(1)-O(18)	90.99(9)
N(2)-Cu(1)-O(9)	82.43(10)	O(9)-Cu(1)-O(18)	98.23(8)
N(2) ^{#1} -Cu(1)-O(9)	97.29(11)	O(9) ^{#1} -Cu(1)-O(18)	98.23(8)

La conformation moléculaire de **C02** et la vue stéréoscopique de la maille cristalline sont reprises respectivement aux figures 1.10. et 1.11.

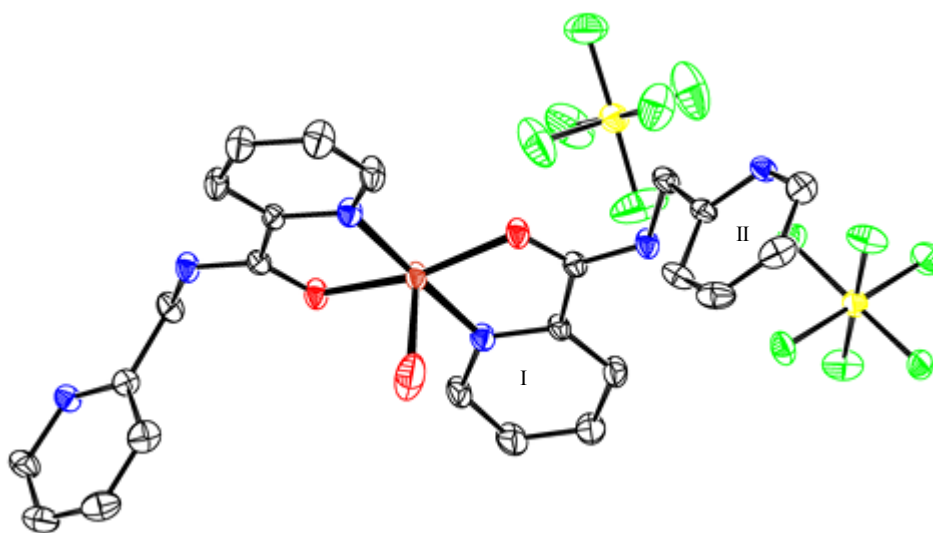


Figure 1.10. Conformation moléculaire de **C02** à l'état cristallin. Les ellipsoïdes de vibration sont représentés avec une probabilité de 30%. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène ne sont pas repris sur la figure, de même qu'un des ions PF_6^- .

La cohésion cristalline est assurée par un certain nombre d'interactions intermoléculaires reprises dans le tableau 1.8. On peut ainsi relever des ponts hydrogène entre les atomes de fluor des ions PF_6^- avec, d'une part, l'azote protoné N(17) de la pyridine et, d'autre part, un des hydrogènes H(18) de la molécule d'eau apicale. En outre, toute une série d'interactions π - π se produit entre les cycles pyridiniques de complexes voisins (Figure 1.11.).

Tableau 1.8. Interactions intermoléculaires au sein de la structure cristalline de **C02** (symétrie #1 : $-x, 1-y, -z$; symétrie #2 : $x, 1+y, z$; symétrie #3 : $1-x, 1-y, 1-z$; symétrie #4 : $-x, 2-y, -z$). Les ponts hydrogène formés entre accepteurs A et donneurs de proton D-H sont caractérisés par une distance 1 D-A, une distance 2 H...A et un angle D-H...A. Les interactions π - π sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes, et par une distance 2 et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle [°]
pont H	N(17)-H(17)...F(53) ^{#1}	2.817(4)	2.0	164
	O(18)-H(18)...F(65) ^{#2}	2.841(4)	2.1	170
π - π parallèle	cycles I-I ^{#3}	4.8	3.6	0
	cycles II-II ^{#4}	4.1	3.3	0

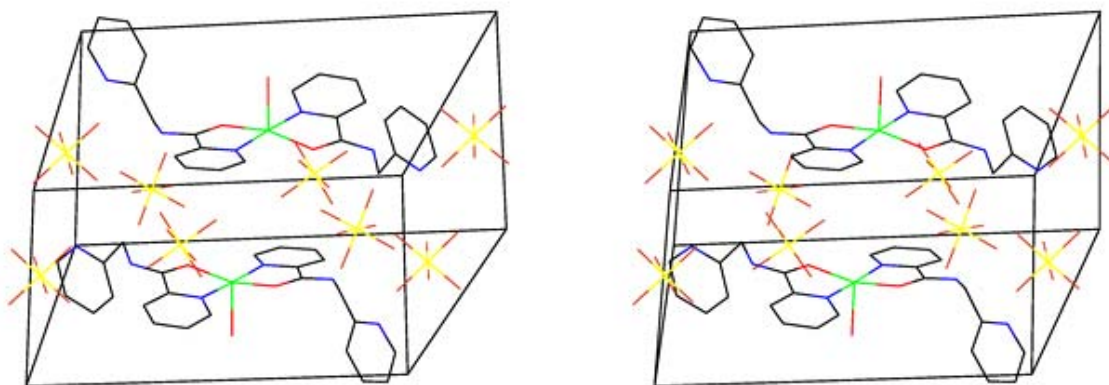


Figure 1.11. Vue stéréoscopique de la maille cristalline de **C02**.

Après ces premières déterminations structurales par DRX, une constatation s'impose d'emblée. Bien que le ligand **L0** soit, à une fonction carbonyle près, semblable à celui de SETCEZ⁴⁸⁹, il se complexe différemment avec le cuivre(II), à l'état cristallin. Différents modes de complexation sont en outre possibles, impliquant cependant toujours l'azote de la pyridine substituée en *ortho* par l'amide*.

Cette observation est *a priori* étonnante. En effet, dans la banque de données structurales de Cambridge, on peut retrouver quatre complexes formés à partir de ce même ligand **L0**. Dans le cas des composés AGEDOF et AGEDUL, deux ligands tridentates s'organisent similairement à SETCEZ autour du centre métallique (respectivement du cobalt (III) et du fer (III))⁶⁸¹. On retrouve également deux

* On postule que cet azote pyridinique sert d'ancrage lors du processus de chélation⁶⁸⁰.

complexes au cuivre(II), RINVIT et RINVOZ⁶⁸² qui adoptent exactement le même mode de complexation que celui de SETCEZ, à partir d'un seul ligand organique tridentate.

On pourrait donc penser qu'une complexation tridentate *via* l'azote déprotoné de l'amide est favorisée. Cependant, on observe ici la formation du complexe **C02**, qui se produit par la coordination de l'oxygène amidique. Cette ambivalence de la fonction amide, qui peut se lier à un métal soit par l'oxygène, soit par l'azote est bien connue⁶⁸⁰. Si on considère les complexes au cuivre (II) formés à partir de ligand picolinamide (pyridine substituée en *ortho* par une amide), seul le mode de complexation NO est observé à l'état cristallin^{489, 683, 684}. Une recherche dans CSD sur le fragment N--C-C(=O)-N-CH₂-C--N complexé à un métal (Figure 1.12.a.), montre qu'une chélation NN est majoritaire, mais que le mode de complexation NO est également fréquemment retrouvé (rapport 121/48).

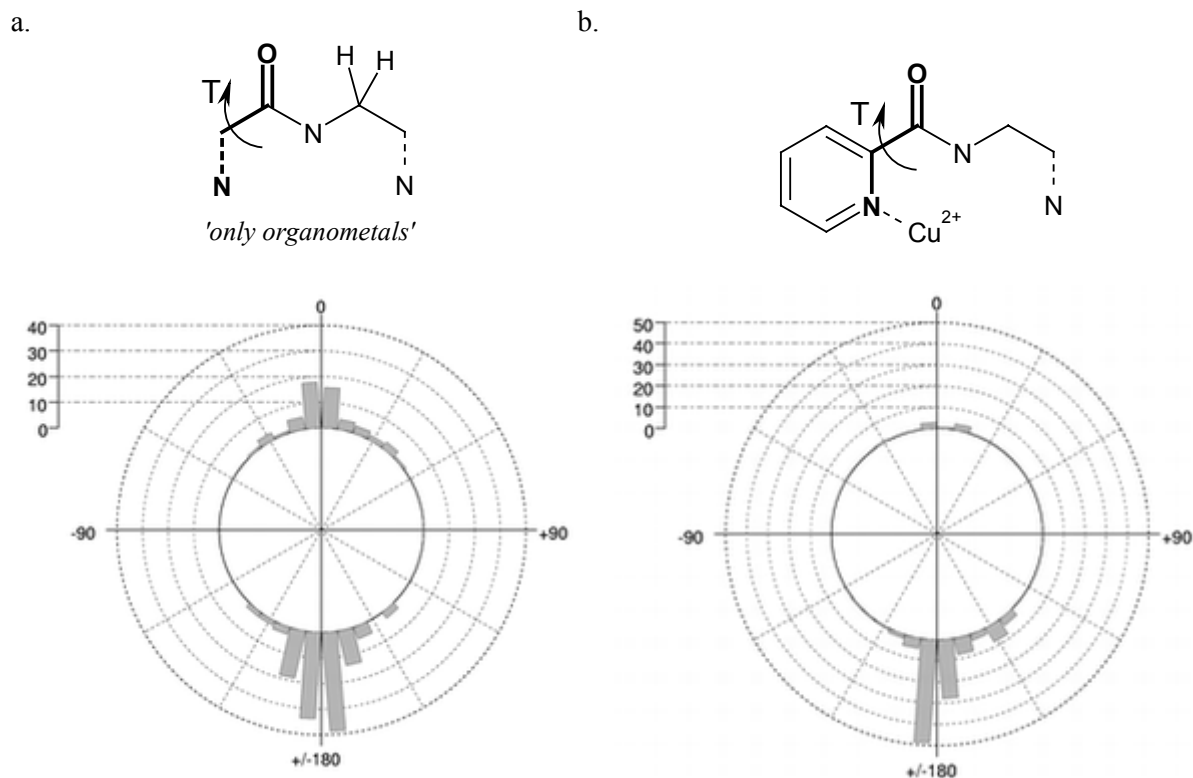


Figure 1.12 Résultats des recherches effectuées dans CSD sur base des fragments ci-dessus. L'angle de torsion T permet de visualiser le mode de complexation rencontré : si $T = 0 \pm 40^\circ$, la complexation est de type NO ; si $T = 180 \pm 40^\circ$, la complexation est de type NN.

Si on affine la recherche en ne considérant que les complexes au cuivre (II) dont le point d'ancrage est un azote pyridinique (fragment $Cu^{2+}-N_{pyr}-C_{pyr}-C(=O)-N-C-C-$

N), on n'observe plus que 8 complexations NO sur 118 (Figure 1.12.b.). De plus, parmi les 110 complexations NN restantes, 89 adoptent un mode de complexation tridentate impliquant le troisième azote disponible.

Cette analyse statistique est claire : lorsque l'on considère des ligands semblables à **L0**, le mode de complexation au cuivre (II) impliquant l'azote amidique déprotoné est majoritaire. Quand un troisième site de coordination est libre, comme par exemple un deuxième azote pyridinique, le ligand adopte généralement une chélation tridentate, comme celle observée dans SETCEZ, et partiellement dans **C01**.

Dès lors, des questions subsistent au terme de cette analyse. Le mode de complexation NO observé pour C02 et pour le ligand bidentate de C01 est-il marginal? Existe-t-il seulement à l'état cristallin? Les complexes C01 et C02 sont-ils différents dès leur complexation en solution? Les contraintes du processus de cristallisation favorisent-elles l'une ou l'autre configuration? Si en solution, les complexes C01 et C02 sont identiques, quelle sera leur forme majoritaire? Enfin, quelles peuvent être les implications de la structuration de ces complexes sur leur activité biologique?

Pour répondre à ces questions, une étude en solution semble indispensable. Elle sera présentée dans le chapitre suivant de cette thèse.

... structure cristallographique du complexe **C1**⁶⁸⁵

Afin d'améliorer les propriétés inhibitrices du composé chef de file SETCEZ, divers ligands ont été synthétisés. Ceux-ci sont un peu plus volumineux que le ligand de SETCEZ, et sont donc susceptibles d'atteindre différents sous-sites enzymatiques. Parmi eux, le ligand **L1** a été complexé au cuivre (II) par l'ajout de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Figure 1.13.). Le complexe résultant **C1** présente une activité inhibitrice environ 500 fois plus élevée que celle de SETCEZ. Ce paragraphe est dédié à l'analyse cristallographique de la structure de **C1**. Elle devrait permettre de poser les bases d'un premier modèle d'interaction enzyme/inhibiteur.

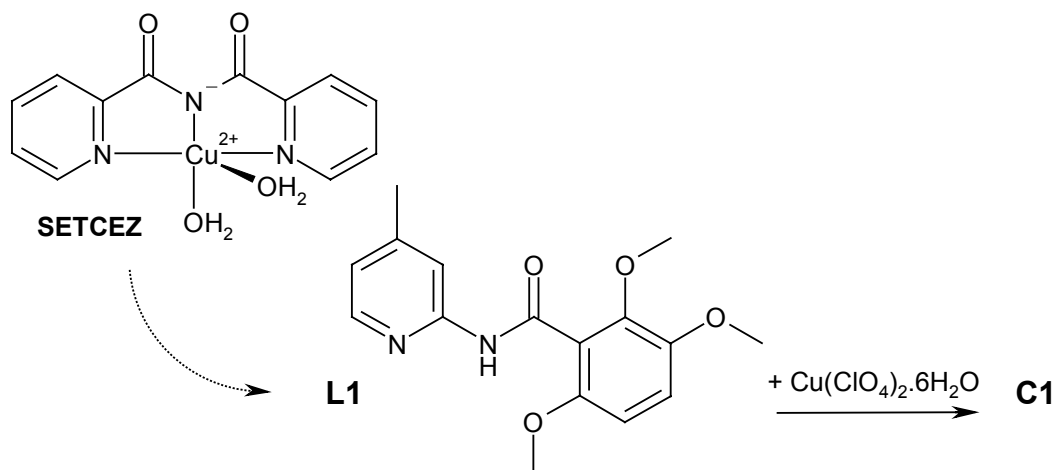


Figure 1.13. Le ligand **L1** est un peu plus volumineux que celui de SETCEZ. Il forme avec l'ion cuivrique le complexe **C1**.

Des monocristaux du complexe **C1** se sont formés par évaporation lente à température ambiante d'une solution obtenue par dissolution de l'échantillon dans du méthanol chaud. Ces monocristaux verts sont instables à l'air libre et doivent être conservés dans la solution mère. Pour réaliser les expériences de diffraction, il a été nécessaire de les enfermer dans un capillaire. Dans ces conditions, **C1** cristallise dans le système triclinique et est caractérisé par le groupe spatial *P*-1. Les paramètres de maille et la structure de **C1** sont repris à la figure 1.14., tandis que les données cristallographiques complètes se trouvent en annexe.

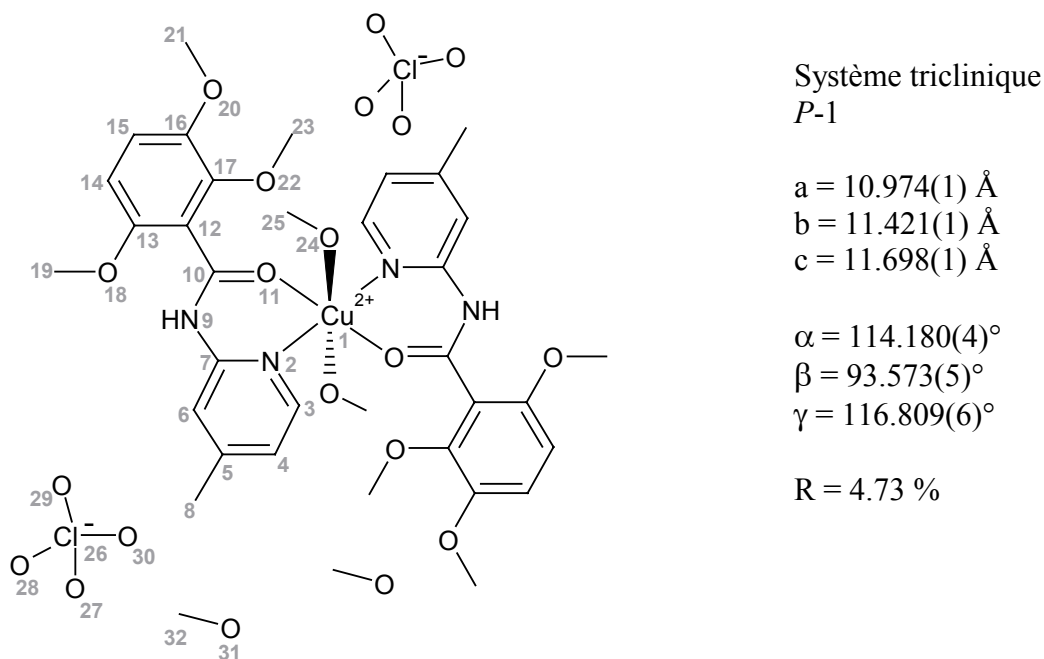


Figure 1.14. Représentation schématique de la structure cristallographique de **C1** ainsi que ses paramètres de maille. L'unité asymétrique comprend un ligand **L1**, le cuivre (II) en position spéciale, un ion perchlorate et une molécule de méthanol issue du solvant. Le complexe porte une charge globale +2 neutralisée par les deux perchlorates.

La structure cristallographique de **C1** a été déposée dans CSD sous le nom de code HOQNEG. Elle est caractérisée par un agencement centrosymétrique, le centre d'inversion se trouvant sur l'ion cuivrique. Ce complexe présente une charge globale +2 neutralisée par deux contre-ions perchlorates. On trouve, en outre, deux molécules de méthanol cocrystallisées au sein de la maille.

Le complexe **C1** est formé par deux ligands **L1** et deux molécules de méthanol issues du solvant qui déterminent autour du cuivre (II) une géométrie octaédrique déformée tétraгонаlement. Le plan équatorial de l'octaèdre est défini par l'azote N(2) et l'oxygène O(11) de chacun des deux ligands bidentates. Ces atomes forment avec le cuivre des liaisons courtes et un angle de chélation de 89.17° . Les deux coordinations en positions apicales sont assurées par l'oxygène O(24) des molécules de méthanol qui forment avec le cuivre des liaisons plus longues (Tableau 1.9.). Les angles de valences observés autour du centre métallique sont proches de la valeur de 90° caractérisant les complexes octaédriques (Tableau 1.10.).

Tableau 1.9. Longueur des liaisons reliant l'ion cuivrique aux différents atomes chélatant de **L1**. Les esd sont mentionnés entre parenthèses. La liaison plus longue en position axiale est reprise en grisé.

Cu(1)---	---N(2)	---O(11)	---O(24)
distance [Å]	2.011(2)	1.955(1)	2.423(2)

Tableau 1.10. Angles de valence formés autour de l'ion cuivrique dans **C1**. Les esd sont repris entre parenthèses. Symétrie #1 : $-x+2, -y+1, -z+1$.

Angles (atomes)	Angles [°]	Angles (atomes)	Angles [°]
N(2)-Cu(1)-N(2) ^{#1}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(24)	86.56(9)
O(11)-Cu(1)-O(11) ^{#1}	180.0	O(11)-Cu(1)-O(24)	89.91(8)
O(24)-Cu(1)-O(24) ^{#1}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(11) ^{#1}	90.83(6)
		N(2)-Cu(1)-O(24) ^{#1}	93.45(8)
N(2)-Cu(1)-O(11)	89.17(6)	O(11)-Cu(1)-O(24) ^{#1}	90.09(8)

La conformation moléculaire du complexe **C1** est reprise à la figure 1.15. On observe que la complexation octaédrique engendre, au niveau de la chélation des deux ligands organiques avec l'ion cuivrique, une structure relativement plane. La déviation du cuivre par rapport au plan moyen défini par les atomes N(2)-C(7)-N(9)-C(10)-O(11) est de 0.613 Å. Seuls, les groupements triméthoxybenzyles branchés sur les amides s'écartent de ce plan. L'angle de torsion formé par les atomes N(9)-C(10)-C(12)-C(13) est en effet de 62.5 degrés.

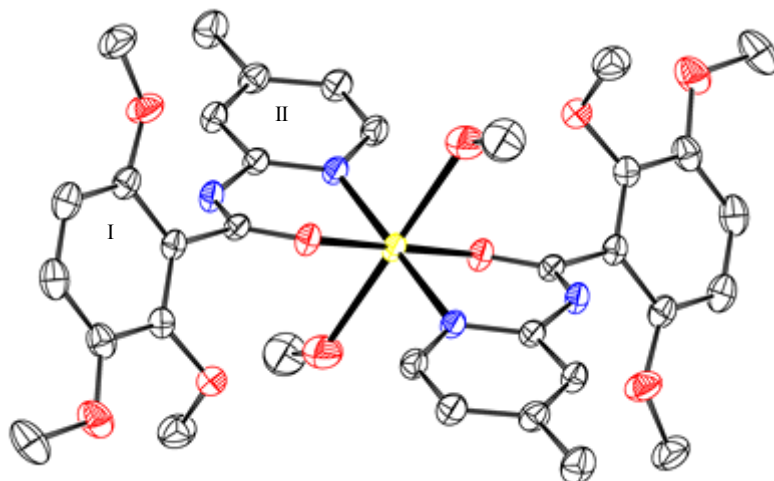


Figure 1.15.
Conformation moléculaire du complexe **C1** à l'état cristallin. Les atomes d'hydrogène, les contre-ions et les molécules de cocrystallisation ne sont pas représentés par souci de clarté. Les ellipsoïdes de vibration sont reprises avec une probabilité de 30%.

La cohésion cristalline est assurée par différentes interactions intermoléculaires reprises dans le tableau 1.11. Ainsi, l'azote amidique NH(9) forme un pont hydrogène avec l'oxygène O(31) de la molécule de méthanol cocrystallisée. Celle-ci est impliquée dans un second pont H avec l'oxygène O(30) d'un ion perchlorate. Ce perchlorate forme à son tour un troisième pont H, via son oxygène O(29) avec le groupement OH(24) d'une molécule de méthanol localisée en position apicale d'un autre complexe (Figure 1.16.). Il se forme en outre une interaction π - π parallèle entre les cycles méthoxybenzyles de complexes voisins.

Tableau 1.11. Interactions intermoléculaires au sein de la structure cristalline de **C1** (symétrie #2 : $x, -1+y, -1+z$; symétrie #3 : $2-x, 1-y, 2-z$). Les ponts hydrogène formés entre accepteurs A et donneurs de proton D-H sont caractérisés par une distance 1 D-A, une distance 2 H...A et un angle D-H...A. Les interactions π - π sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes, et par une distance 2 et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle [°]
pont H	N(9)-H(9)...O(31)	2.823(3)	1.974(3)	169.3(3)
	O(31)-H(31)...O(30)	2.797(6)	2.02(5)	173(6)
	O(24)-H(24)...O(29) ^{#2}	2.741(14)	2.12(5)	155(6)
π - π parallèle	cycles I-I ^{#3}	3.5	3.4	0

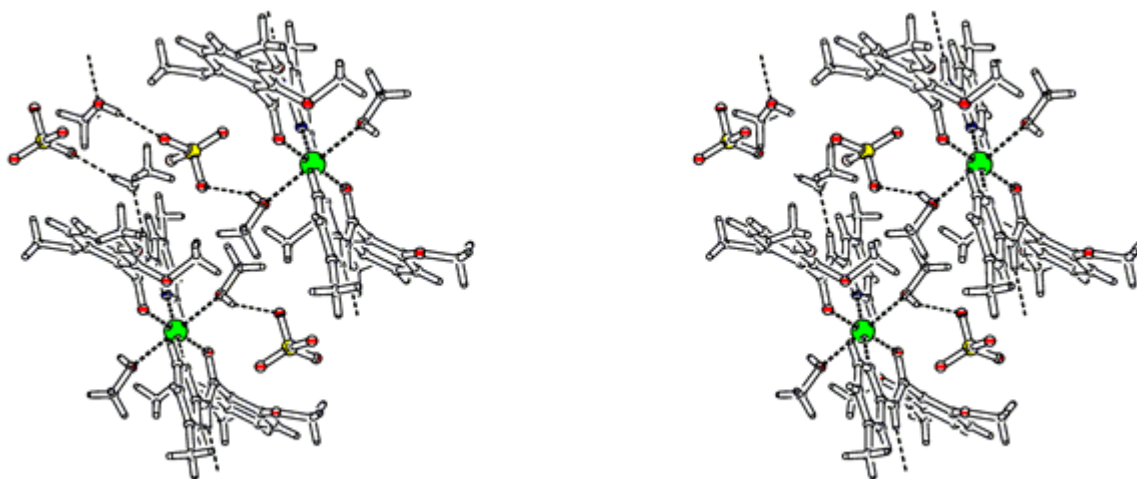


Figure 1.16. Vue stéréoscopique des interactions intermoléculaires au sein de l'empilement cristallin de **C1**. Un réseau de ponts H peut être observé.

Lorsque l'on considère la structure du ligand **L1**, il est difficile *a priori* d'imaginer une complexation semblable à celle de SETCEZ. Il faudrait, pour ce faire, passer par la formation d'un cycle à 4 chaînons défavorable impliquant l'azote de la pyridine et l'azote déprotoné de l'amide⁶⁸⁰. L'oxygène d'un groupement méthoxy pourrait alors servir de troisième site de coordination. En effet, la détermination de la structure cristallographique de **C1** révèle un mode de complexation plutôt similaire à celui de **C02** se produisant via l'azote pyridinique et l'oxygène amidique de deux ligands bidentates.

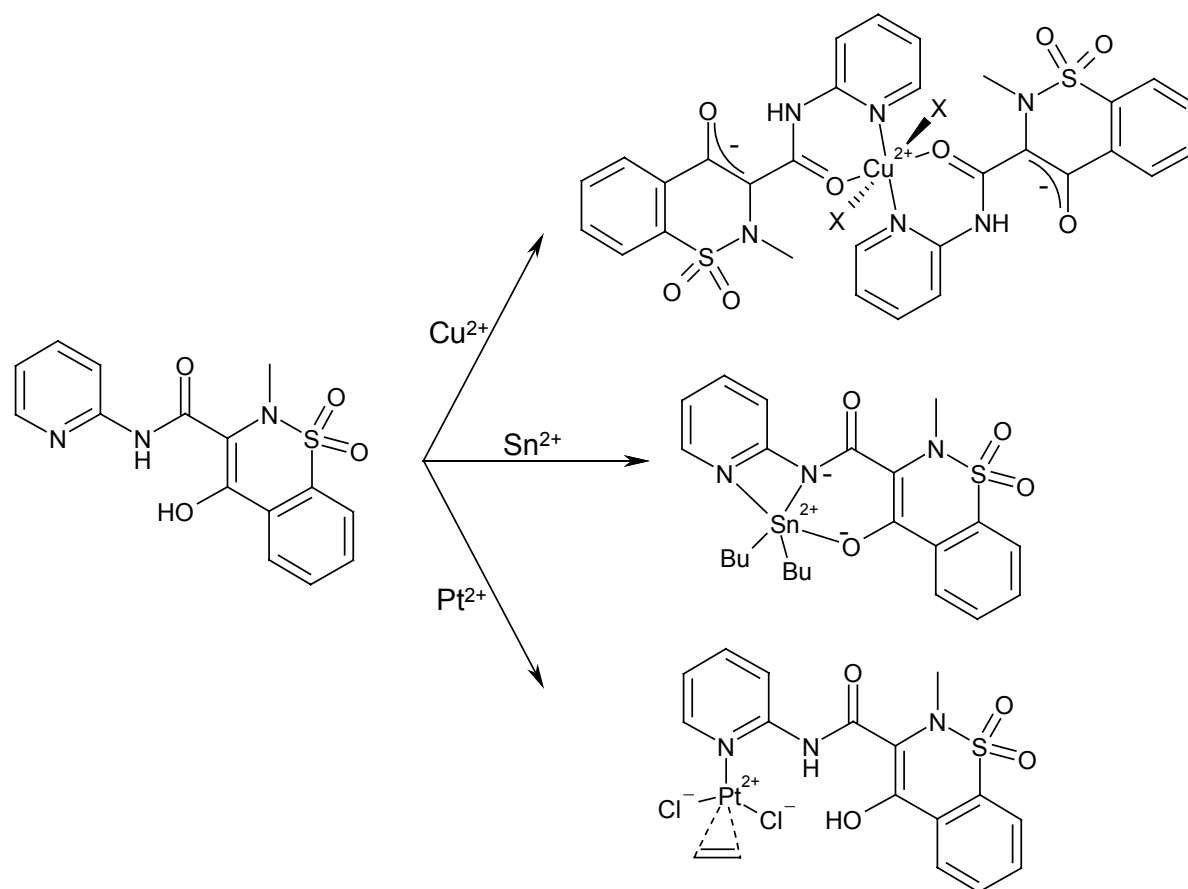


Figure 1.17.: Le piroxicam possède des similarités structurales avec **L1**. Il adopte différents modes de complexation suivant la nature de l'ion métallique. En présence de cuivre (II), la structuration des ligands autour du centre métallique est semblable à celle de **C1**.

Une recherche dans CSD basée sur le fragment $M\text{--}N\text{--}C\text{--}N\text{--}C(=O)\text{--}C\text{--}C\text{--}O^*$ montre que, bien que le mode de complexation $N_{\text{pyr}} O_{\text{amide}}$ soit majoritaire, les deux types de chélation peuvent être rencontrés. On peut citer ainsi l'exemple du piroxicam, un anti-inflammatoire dont nous avons déjà parlé dans le chapitre 4 de l'introduction générale, et qui présente un certain nombre de similarités structurales avec **L1**. Cet anti-inflammatoire posséderait de meilleures propriétés biologiques lorsqu'il est complexé à un ion métallique. Suivant la nature de cet ion, diverses complexations sont observées : avec le cuivre (II) et le cadmium (II), on retrouve une chélation $N_{\text{pyr}} O_{\text{amide}}$ semblable à celle de **C1** ; celle-ci est confirmée en solution par différentes études spectroscopiques⁵⁷¹. Avec l'étain (II), par contre, un complexe tridentate se forme *via* l'azote déprotoné de l'amide⁵⁷⁰. Enfin, le piroxicam se comporte en ligand monodentate lorsqu'il complexe le platine (II) par l'azote pyridinique⁶⁸⁶ (Figure 1.17.).

* Avec M correspondant à un centre métallique, le symbole '--' désignant n'importe quel type de liaison, et les atomes susceptibles d'intervenir dans la coordination étant repris en caractères italiques gras.

... structure cristallographique des complexes **C2**⁶⁸⁵ et **C4**, ainsi que du ligand **L3**

Outre le ligand **L1**, trois autres ligands de type quinoléine carboxamide **L2**, **L3** et **L4** ont découlé du processus d'optimisation de SETCEZ (Figure 1.18.). Complexés au cuivre (II), ils présentent des activités biologiques diverses. Nous décrivons ici leur structure à l'état cristallin.

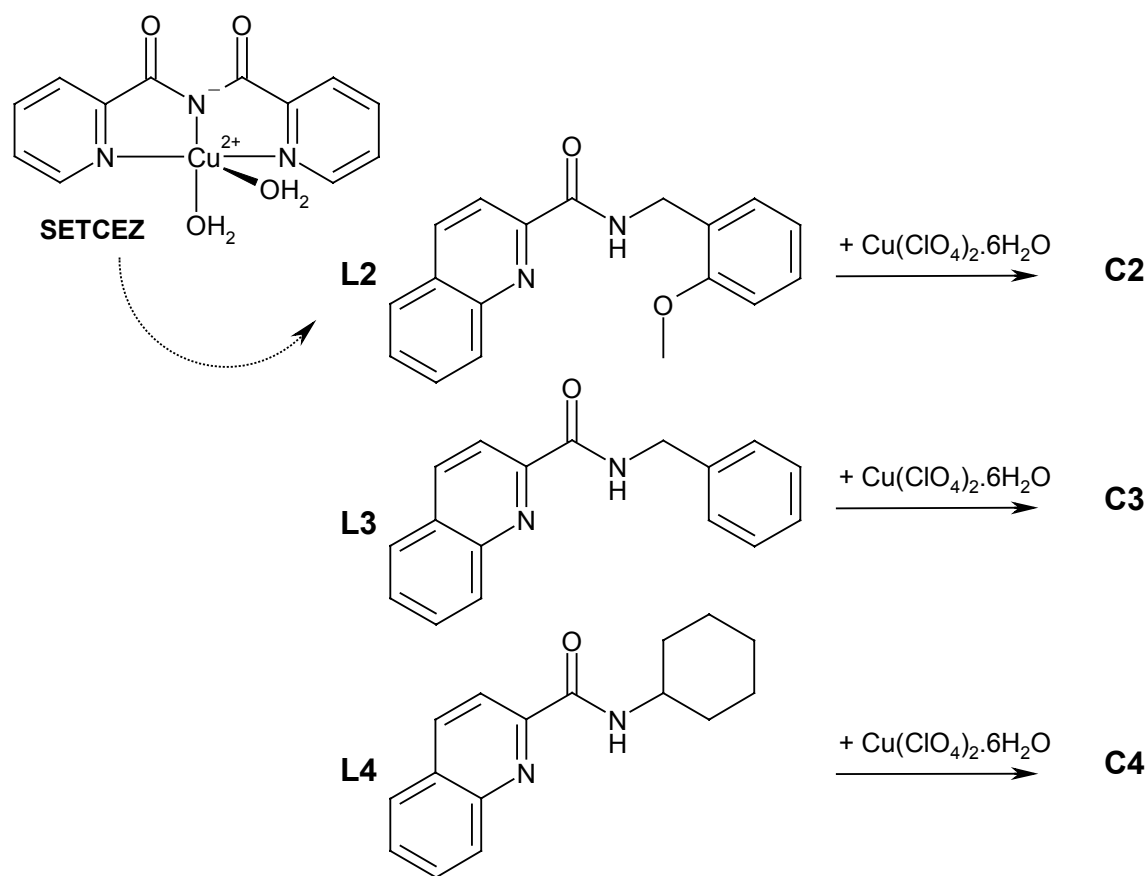


Figure 1.18. Les ligands **L2**, **L3** et **L4** découlent du processus d'optimisation de SETCEZ et sont basés sur un squelette de type quinoléine carboxamide. En présence d'ions cuivriques, ils forment respectivement les complexes **C2**, **C3** et **C4**.

Les monocristaux issus de la dissolution des composés **2**, **3** et **4** ont tous été obtenus par évaporation lente à température ambiante. Les conditions de cristallisation et les paramètres de maille de ces trois composés sont repris dans le tableau 1.12.

Tableau 1.12. Conditions de cristallisation et paramètres de maille des complexes **C2** et **C4**, ainsi que du ligand **L3**

	C2	L3	C4
Solvant de cristallisation	mélange 1:1 méthanol/eau	mélange 1:1:1 eau /méthanol/isopropanol chaud	mélange 1:1 éthanol/isopropanol
Type de cristaux	verts stables à l'air libre	translucides stables à l'air libre	verts stables à l'air libre
Système	triclinique	monoclinique	triclinique
Groupe spatial	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> -1
Paramètres de maille	a = 8.544(1) Å b = 8.858(1) Å c = 13.707(1) Å α = 88.050(5)° β = 72.984(5)° γ = 64.944(4)°	a = 8.426(1) Å b = 17.823(1) Å c = 9.420(1) Å α = 90.0° β = 101.210(5)° γ = 90.0°	a = 8.799(1) Å b = 9.623(1) Å c = 11.042(1) Å α = 71.614(6)° β = 87.014(5)° γ = 69.283(7)°
Indice de désaccord R	4.32 %	3.77 %	5.95 %
Code CSD	HOQNIK	---	---

Contre toute attente, l'analyse structurale par diffraction des rayons X des cristaux obtenus suite aux essais de cristallisation du composé **C3** n'a pas permis de mettre en évidence le complexe : seul le ligand **L3** est présent au sein de ces cristaux. La conformation moléculaire de **L3** est reprise à la figure 1.19.

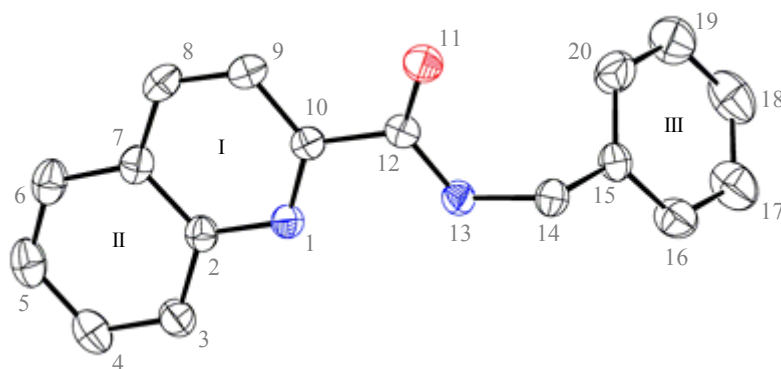


Figure 1.19.
Conformation moléculaire et numérotation du ligand **L3** à l'état cristallin. Les atomes d'hydrogène ne sont pas inclus dans la figure par souci de clarté. Les ellipsoïdes de vibration sont représentés avec une probabilité de 30%.

Seul le groupement benzyle substituant l'amide s'écarte du plan formé par la fonction principale quinoléine carboxamide, les angles dièdres C(12)-N(13)-C(14)-C(15) et N(13)-C(14)-C(15)-C(16) valant respectivement -94.43° et -112.53°. Un pont hydrogène intramoléculaire peut être observé entre l'azote protoné de l'amide NH(13) et l'azote N(1) de la quinoléine. Il est caractérisé par une distance entre azotes de

2.691(3) Å, une distance H(13)-N(1) de 2.291(15) Å et un angle N(13)-H(13)-N(1) de 107.3(11)°.

Tableau 1.13. Interactions intermoléculaires au sein de la structure cristalline de **L3** (symétrie #1 : $x, 1/2-y, 1/2+z$; symétrie #2 : $1-x, -y, -z$; symétrie #3 : $2-x, -y, -z$; symétrie #4 : $1+x, 1/2-y, 1/2+z$; symétrie #5 : $1-x, 1/2-y, 1/2+z$; symétrie #6 : $x, 1/2-y, -1/2+z$). Les ponts hydrogène formés entre accepteurs A et donneurs de proton D-H sont caractérisés par une distance 1 D-A, une distance 2 H...A et un angle D-H...A. Les interactions π - π sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes, et par une distance 2 et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle [°]
pont H	N(13)-H(13)...O(12) ^{#1}	2.934(13)	2.214(15)	138.1(12)
π - π parallèle	cycles I-I ^{#2}	3.7	3.5	0
	cycles I-II ^{#2}	3.9	3.5	1
	cycles II-II ^{#3}	3.8	3.4	0
π - π perpend.	cycles I-III ^{#4}	5.4	-	86
	cycles III-II ^{#5}	5.3	-	87
	cycles III-III ^{#6}	5.3	-	88

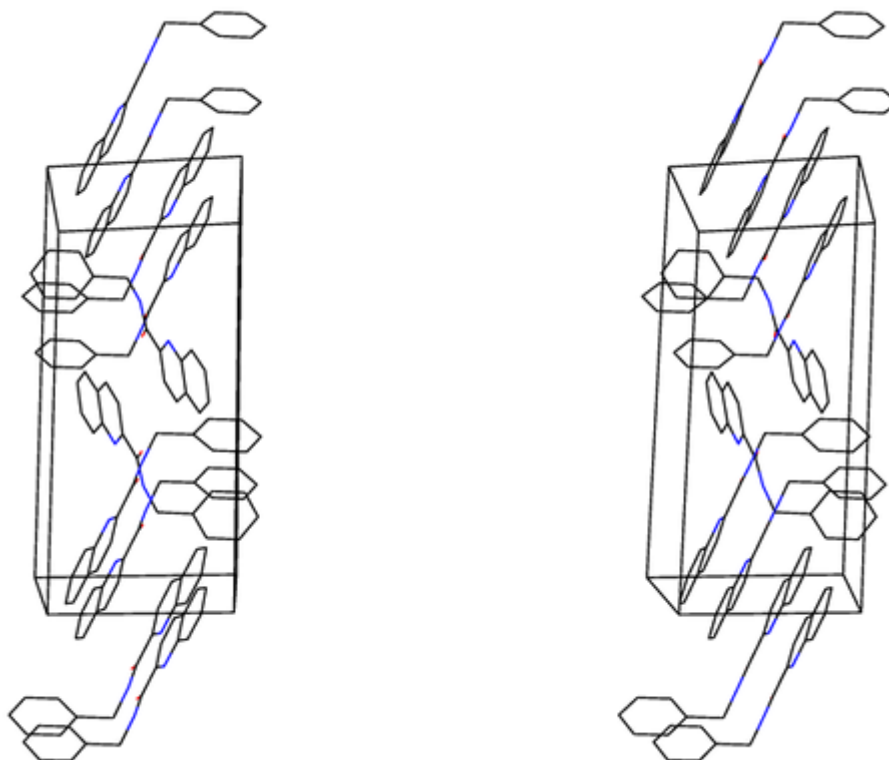


Figure 1.20. Vue stéréoscopique de la maille cristalline de **L3**.

La cohésion cristalline est assurée par différentes interactions intermoléculaires repris dans le tableau 1.13. Ainsi, on observe un pont H entre l'azote protoné NH(13) amidique et l'oxygène O(12) de l'amide d'une molécule voisine. De nombreux contacts π - π perpendiculaires décalés ou parallèles interviennent en outre entre cycles aromatiques de molécules différentes. Une vue stéréoscopique de l'empilement cristallin au sein de la maille est repris à la figure 1.20.

La résolution cristallographique des composés **C2** et **C4** a débouché sur la structure des complexes représentés schématiquement à la figure 1.21. Les structures cristallographiques de **C2** et de **C4** sont caractérisées, tout comme celle de **C1**, par une géométrie centrosymétrique, le centre d'inversion se trouvant sur l'ion cuivrique. Le complexe sont formés à partir de deux ligands bidentates et deux contre-ions perchlorates qui déterminent autour du cuivre (II) un environnement octaédrique déformé tétragonalement. Le plan équatorial est défini par l'azote quinoléique N(2) et par l'oxygène amidique O(13) de chaque ligand qui forment avec le cuivre (II) des liaisons courtes et des angles de chélation respectivement de 80.87 degrés pour **C2** et de 81.11 pour **C4**. Les coordinations en position apicale sont occupées, quant à elles, par l'oxygène O(24)/O(22) des perchlorates. Ils assurent la neutralité du cristal et forment avec l'ion cuivrique des liaisons plus longues (Tableau 1.14.).

Tout comme pour **C1**, différents modes de coordination s'offraient à **C2**. On peut ainsi imaginer assez aisément une complexation tridentate $N_{\text{quin}}N_{\text{amide}}O_{\text{méthoxy}}$ semblable à celle de SETCEZ, impliquant l'azote quinoléique, l'azote amidique et l'oxygène du groupement méthoxy substituant le benzyle. De nouveau, on observe ici la double chélation bidentate $N_{\text{quin}}O_{\text{amide}}$. Dans CSD, une recherche sur le fragment M-*N*-C-C(=O)-*N*-C-C--C--O ne permet de pointer que **C2** et un autre complexe au cuivre (II) PICAXC⁶⁸⁷. Ce dernier adopte un mode de complexation tridentate $N_{\text{quin}}N_{\text{amide}}O_{\text{méthoxy}}$ au sein d'un édifice binucléaire à deux ions cuivriques.

Les angles de valence autour du centre métallique ont des valeurs comprises entre 78.03 et 101.97 degrés pour **C2** et entre 81.11 et 98.89 degrés pour **C4** (Tableau 1.15.). Elles s'écartent donc, pour certaines, de la valeur idéale de 90° caractérisant une géométrie octaédrique. On peut expliquer ces écarts par la tension engendrée, lors de la complexation, par la formation de cycles à cinq chaînons chélatant le cuivre. L'agitation thermique que subissent les deux ions perchlorates en position apicale pourrait amplifier le phénomène.

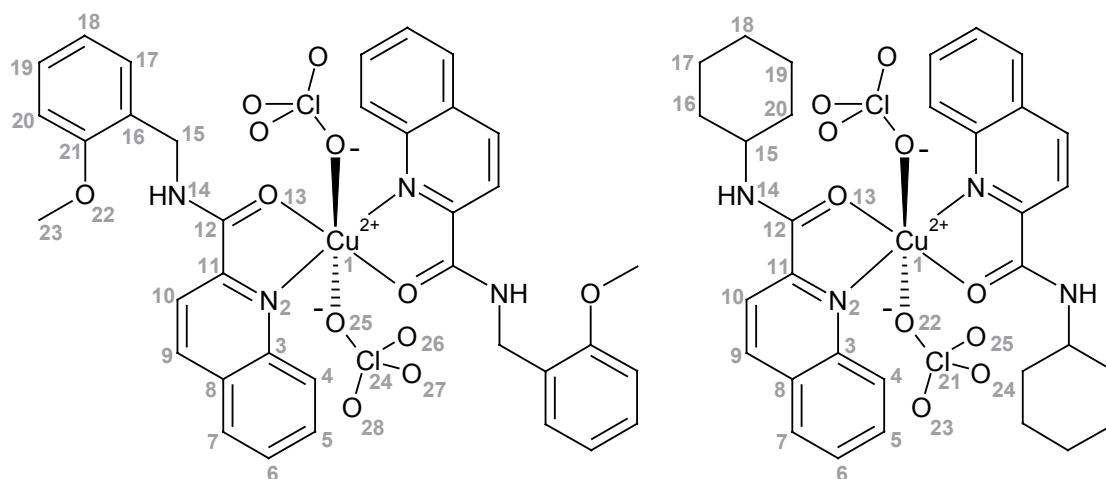


Figure 1.21. Représentation schématique de la structure cristallographique de **C2** et de **C4**. L'unité asymétrique de ces deux complexes comprend un ligand organique **L2** ou **L4**, un perchlorate et le cuivre en position spéciale*. Les complexes sont globalement neutres.

Tableau 1.14. Longueurs des liaisons [Å] reliant l'ion cuivrique aux différents atomes chélatants de **L2** et de **L4**. Les esd sont mentionnés entre parenthèses. La liaison plus longue en position axiale est reprise en grisé.

	Cu(1)---	---N(2)	---O(13)	---O(25)/O(22)
C2		2.096(2)	1.924(2)	2.464(8)
C4		2.068(3)	1.932(2)	2.536(3)

Tableau 1.15. Angles de valence formés autour de l'ion cuivrique dans **C2** et **C4**. Les esd sont repris entre parenthèses. Symétrie #1 : -x+2, -y, -z ; Symétrie #1' : -x,-y,1-z.

	Angles (atomes)	Angles [°]	Angles (atomes)	Angles [°]
C2	N(2)-Cu(1)-N(2) ^{#1}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(25)	94.1(9)
	O(13)-Cu(1)-O(13) ^{#1}	180.0	O(13)-Cu(1)-O(25)	78.03(19)
	O(25)-Cu(1)-O(25) ^{#1}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(13) ^{#1}	99.13(7)
			N(2)-Cu(1)-O(25) ^{#1}	85.9(2)
	N(2)-Cu(1)-O(13)	80.87(7)	O(13)-Cu(1)-O(25) ^{#1}	101.97(19)
C4	N(2)-Cu(1)-N(2) ^{#1'}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(22)	90.00(11)
	O(13)-Cu(1)-O(13) ^{#1'}	180.0	O(13)-Cu(1)-O(22)	96.57(10)
	O(22)-Cu(1)-O(22) ^{#1'}	180.0	N(2)-Cu(1)-O(13) ^{#1'}	98.89(10)
			N(2)-Cu(1)-O(22) ^{#1'}	90.00(11)
	N(2)-Cu(1)-O(13)	81.11(10)	O(13)-Cu(1)-O(22) ^{#1'}	83.43(10)

* Une position spéciale, caractéristique du groupe spacial étudié, est localisée à l'intersection entre plusieurs unités asymétriques. L'atome de cuivre est ici partagé par deux unités asymétriques.

Les conformations moléculaires des complexes **C2** et **C4** sont reprises à la figure 1.22. On observe que la complexation octaédrique engendre, au niveau de la chélation des deux ligands **L2** et **L4** avec l'ion cuivrique, une structure relativement plane.

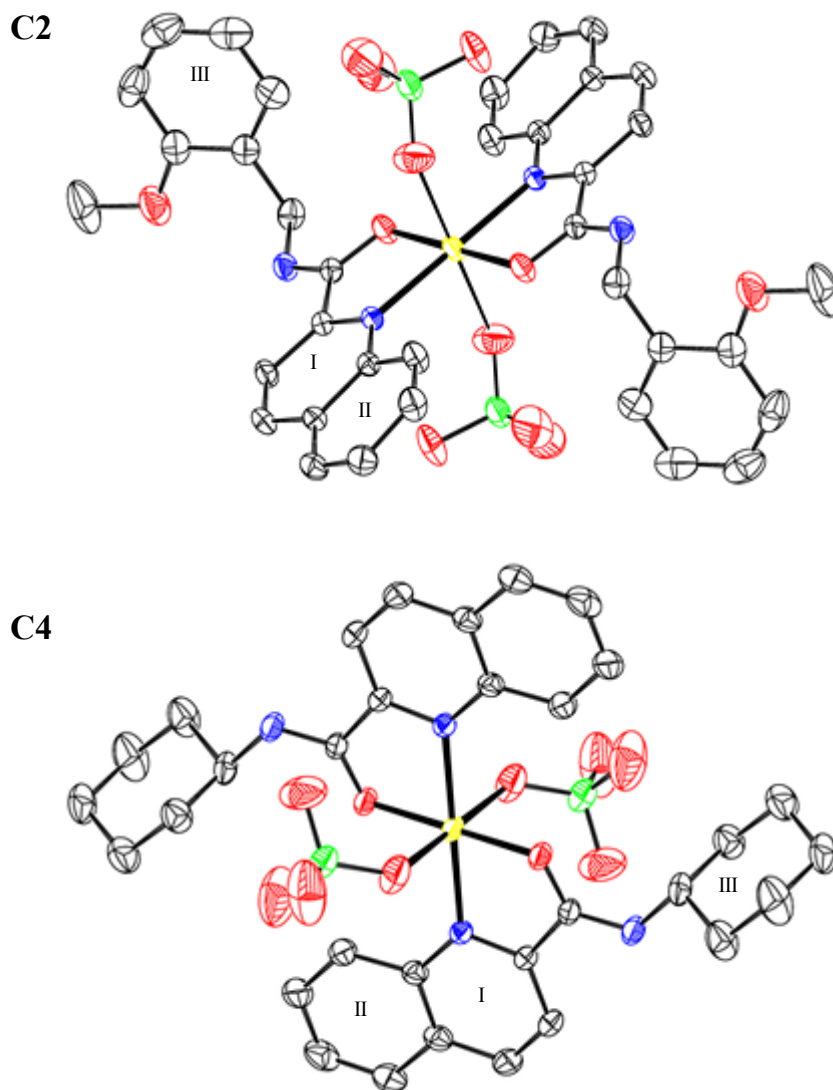


Figure 1.22. Conformation moléculaire des complexes **C2** et **C4** à l'état cristallin. Les atomes d'hydrogène ne sont pas inclus dans la figure par souci de clarté. Les ellipsoïdes de vibration sont représentés avec une probabilité de 30%.

Dans le cas de **C2**, le cuivre (II) subit une déviation de 0.274 Å par rapport au plan moyen formé par les atomes N(2)-C(11)-C(12)-O(13). Les groupements méthoxybenzyles sortent de ce plan, les angles de torsion C(12)-N(14)-C(15)-C(16) et N(14)-C(15)-C(16)-C(17) valant respectivement 87.3 et -95.9 degrés. Dans le cas de **C4**, la déviation du cuivre (II) par rapport à ce plan moyen est de 0.394 Å. Seul le

groupement cyclohexane branché sur l'amide sort de cette configuration plane avec un angle dièdre C(12)-N(14)-C(15)-C(16) de 142.29°.

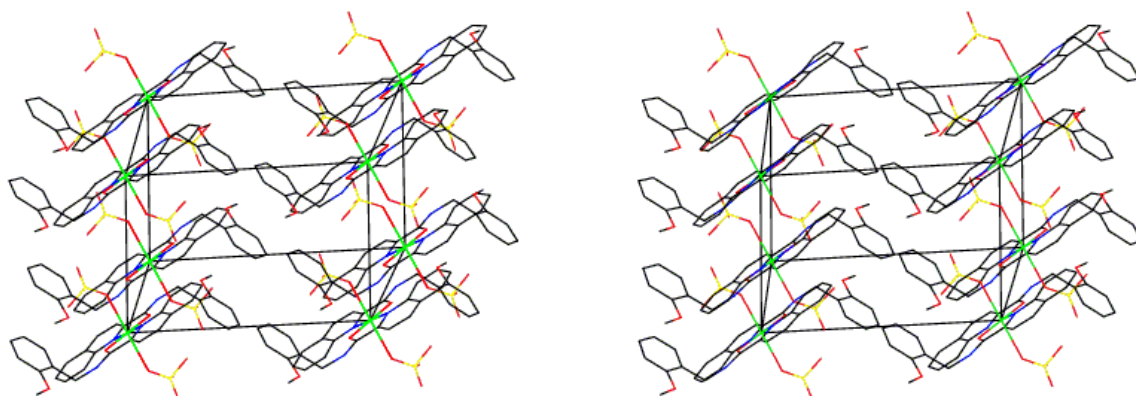
La cohésion cristalline des deux complexes est assurée par diverses interactions intermoléculaires reprises dans le tableau 1.16. et illustrées à la figure 1.23. On peut recenser, pour les deux complexes, d'une part, un pont hydrogène formé entre l'azote amidique protoné NH(14) et l'oxygène O(26) d'un perchlorate en position apicale d'un autre complexe. D'autre part, des contacts π - π parallèles ou perpendiculaires se produisent entre cycles aromatiques de complexes voisins.

Tableau 1.16. Interactions intermoléculaires au sein de la structure cristalline de **C2** et de **C4** (symétrie #2 : -1+x,1+y,z ; symétrie #3 : 1-x,-y,-z ; symétrie #4 : 1-x,1-y,1-z ; symétrie #2' : x,-1+y,z, symétrie #3' : 1-x,-y,1-z). Les ponts hydrogène formés entre accepteurs A et donneurs de proton D-H sont caractérisés par une distance 1 D-A, une distance 2 H...A et un angle D-H...A. Les interactions π - π sont caractérisées par une distance 1 entre centroïdes, et par une distance 2 et un angle dièdre entre plans moyens des cycles impliqués dans l'interaction.

	interaction	partenaires	distance 1 [Å]	distance 2 [Å]	angle [°]
C2	pont H	N(14)-H(14)...O(26) ^{#2}	2.984(4)	2.140(4)	166.6(2)
	π - π parallèle	cycles I-I ^{#3}	3.7	3.5	0
		cycles I-II ^{#3}	3.8	3.6	4
		cycles III-III ^{#4}	3.8	3.5	0
	π - π perpend.	cycles II-III ^{#3}	5.1	-	70
C4	pont H	N(14)-H(14)...O(26) ^{#2'}	3.060(6)	2.4	134
	π - π parallèle	cycles I-I ^{#3'}	3.7	3.5	0
		cycles I-II ^{#3'}	3.7	3.5	5

Au terme de cette étude structurale des composés **2**, **3** et **4**, une observation s'impose. Le ligand **L3** est structuralement très proche de **L2**, mis à part la présence d'un groupement méthoxy sur le noyau benzénique de **L2**. Nous n'avons cependant pas réussi à cristalliser le complexe **C3**. Par contre, le remplacement du groupement benzyle par un cyclohexane dans le ligand **L4**, permet, à l'image de **C2**, de retrouver **C4** complexé à l'état cristallin.

C2



C4

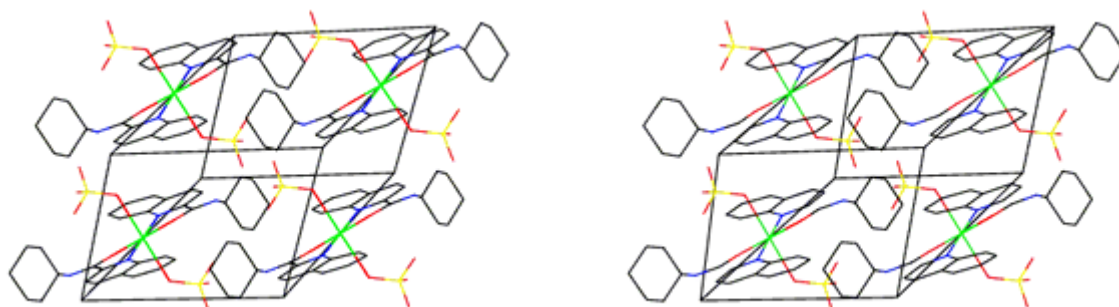


Figure 1.23. Vue stéréoscopique de la maille cristalline de **C2** et **C4**.

On peut, dès lors, se poser la question de la stabilité de ces dérivés et de l'influence des substituants présents sur les ligands. Pourquoi **C3** n'existe-t-il pas à l'état cristallin et bien **C2** et **C4**? Y-a-t-il eu, lors de la cristallisation, un déplacement de l'équilibre en faveur des formes décomplexées? Plus fondamentalement, si **C3** n'existe pas sous forme de complexe cristallin, alors pourquoi possède-t-il une activité biologique semblable à celle de **C2** ? Cette dernière question est d'autant plus troublante que la série de ligands **L0** à **L4** ne présente aucune activité antiprotéase.

Nous proposerons, dans le point 1.2., des pistes de réponses à ces questions. Auparavant, pour clôturer ces travaux de cristallographie, il est important de discuter d'une caractéristique structurale commune à tous les complexes au cuivre (II) : leur propension à subir des déformations géométriques sous l'effet Jahn-Teller.

... l'effet Jahn-Teller, caractéristique des complexes au cuivre (II)⁶⁸⁵

L'analyse des différentes structures cristallographiques révèle l'existence autour de l'ion cuivrique de deux types de liaisons. Au sein de chaque complexe, on retrouve en effet quatre liaisons courtes formant un plan équatorial autour du centre métallique. De part et d'autre de ce plan, en position apicale, on retrouve une ou deux liaisons cuivre-ligand plus longues. Les liaisons courtes N-Cu ont une longueur moyenne de 2.016 Å et les liaisons O-Cu de 1.946 Å. Par contre, les molécules de solvant ou les contre-ions complexés en positions apicales, forment avec le cuivre des liaisons O-Cu d'une distance moyenne de 2.427 Å (Tableau 1.17.).

Tableau 1.17. Longueur [Å] des liaisons autour de l'ion cuivrique pour les différents complexes. Les esd sont repris entre parenthèses.

distances [Å] Cu---	courtes		longues
	---N	---O	---O
C01	2.024(8) 2.016(8) 1.921(9) 2.020(9)		2.462(8) 2.427(8)
C02	1.970(3)	1.973(2)	2.234(5)
C1	2.011(2)	1.955(1)	2.423(2)
C2	2.096(2)	1.924(2)	2.464(8)
C4	2.068(3)	1.932(2)	2.536(3)
moyenne	2.016(9)	1.946(2)	2.424(8)

On peut noter d'emblée que les liaisons courtes N-Cu et O-Cu prennent des valeurs assez constantes allant respectivement de 1.910 à 2.096 Å et de 1.924 à 1.973 Å, tandis que les liaisons longues sont caractérisées par des distances plus variables allant de 2.234 à 2.536 Å.

Une recherche statistique dans CSD, la banque de données structurales de Cambridge, permet d'évaluer la fréquence de cette déformation au sein de complexes au cuivre (II) similaires.

Deux distributions ont été étudiées. Elles concernent les longueurs de liaisons entre un cuivre à l'étage d'oxydation +2 et un oxygène (Figure 1.24.a.) ou un azote

(Figure 1.24.b.). On observe une bonne corrélation entre les géométries issues de CSD et nos propres résultats cristallographiques qui se situent, dans les différents cas envisagés, près du centre de la distribution.

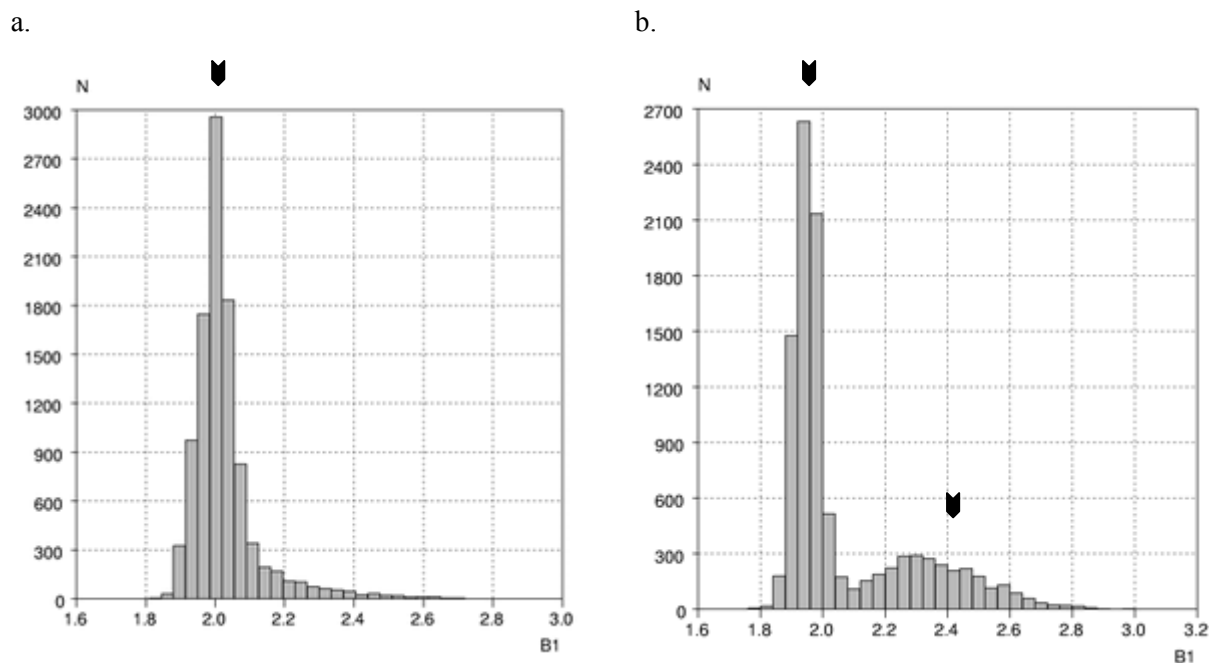


Figure 1.24. Distribution des longueurs de liaison a. N-Cu²⁺ et b. O-Cu²⁺ au sein de CSD. Les distances moyennes observées dans les complexes **C0-C4** sont pointées par une flèche noire. Chaque histogramme porte sur 10000 liaisons. N et B1 représentent respectivement la fréquence et la longueur des liaisons étudiées.

Le graphe reprenant la distribution des distances de liaison O-Cu²⁺ montre clairement un phénomène de déformation. En effet, deux distributions peuvent être distinguées: la première, centrée sur une longueur de 1.95 Å, est caractéristique des liaisons courtes formées avec l'ion cuivrique, tandis que la deuxième, centrée sur 2.30 Å, reflète une déformation d'élongation. Les distances moyennes O-Cu²⁺ observées dans les complexes **C0-C4**, en position équatoriale (courtes) ou axiale (longues), se situent bien près du centre de ces distributions (Figure 1.24.b., flèches noires). On peut, en outre, remarquer que la première distribution est nettement plus étroite que la deuxième, et s'organise autour d'une valeur moyenne. Par contre, la distribution reflétant les déformations d'élongation est plus diffuse et semble moins focalisée sur une valeur particulière. La gamme de distances couverte par ce type de liaison s'étend d'environ 1.8 Å à 2.9 Å et enlève la possibilité de prédire *a priori* l'ampleur de la déformation.

Le graphe se rapportant à la distribution des liaisons N-Cu²⁺ montre moins clairement ce phénomène d'élongation. Remarquons cependant que la distribution

commence de manière abrupte vers 1.9 Å, passe rapidement par un maximum à 2.0 Å, chute symétriquement jusqu'à 2.1 Å puis s'étale lentement sur les 0.5 Å suivants. On peut en déduire que les deux distributions correspondant aux liaisons N-Cu²⁺ courtes et longues existent, bien que la deuxième porte sur un nombre beaucoup plus faible de composés et est donc plus difficilement observable. En fait, les ligands apicaux observés dans CSD sont souvent des contre-ions ou des molécules de solvant qui assurent leur coordination *via* un atome d'oxygène. On retrouve donc plus rarement des liaisons N-Cu²⁺ longues.

L'origine de ce phénomène de déformation peut être expliqué par le théorème de Jahn-Teller qui a été développé dans le contexte de la théorie du champ cristallin⁶⁸⁸⁻⁶⁹¹.

La théorie du champ cristallin date de la fin des années 1920 et considère que l'interaction entre un métal et ses ligands est purement électrostatique. Des modifications ultérieures ont introduit un caractère covalent à cette interaction. Ces versions adaptées de la théorie originale sont généralement appelées théorie du champ des ligands. Les quelques paragraphes suivants lui sont consacrés.

Les cinq orbitales *d* d'un ion métallique isolé à l'état gazeux sont caractérisées par une même énergie : elles sont dégénérées. Si on place autour du métal un champ sphérique de charges négatives, une répulsion se produit entre ces dernières et les électrons des orbitales *d*, qui voient, dès lors, leur énergie augmenter. En présence de ligands réels, la symétrie du système n'est plus sphérique et les orbitales *d* sont différemment affectées par les répulsions entre charges négatives. On observe alors une levée de dégénérescence qui constitue l'essence de la théorie du champ cristallin.

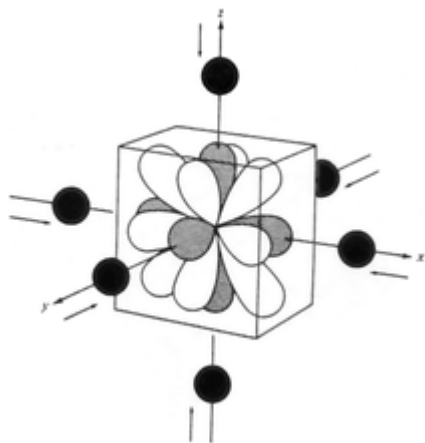


Figure 1.25. Complexe octaédrique formé lors de l'approche de six ligands. Les orbitales d localisées le long des axes cartésiens, en gris foncé, seront plus affectées par les répulsions électroniques que les autres orbitales représentées en blanc⁶⁸⁸.

Ainsi, on peut considérer le cas de six ligands formant un complexe octaédrique : les ligands sont disposés symétriquement selon les axes d'un référentiel cartésien, l'ion métallique étant placé à l'origine des axes (Figure 1.25.). Comme dans le cas d'un champ sphérique, la répulsion entre charges négatives provoque une augmentation des énergies de toutes les orbitales d . Il est toutefois évident que les orbitales d situées le long des axes cartésiens (la d_{z^2} et la $d_{x^2-y^2}$) vont être plus fortement repoussées que celles dont les lobes se trouvent entre les axes (la d_{xy} , la d_{yz} et la d_{xz}).

On peut dès lors les répartir en deux ensembles : les orbitales d_{z^2} et $d_{x^2-y^2}$, appelées e_g , de haute énergie, et les orbitales d_{xy} , d_{yz} et d_{xz} , appelées t_{2g} , de plus faible énergie (Figure 1.26.). L'ampleur du dédoublement des orbitales e_g et t_{2g} dans un complexe octaédrique est noté Δ_0 ou encore $10Dq$. On peut remarquer, sur la figure 1.26., que cette levée de dégénérescence n'altère pas l'énergie moyenne des cinq orbitales d .

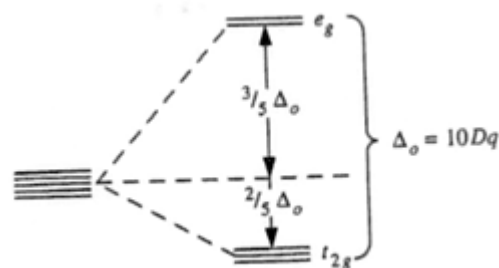


Figure 1.26. Levée de dégénérescence d ⁶⁸⁸.

Lorsque deux ligands positionnés en *trans* dans un complexe octaédrique, par exemple le long de l'axe z , bougent de part et d'autre du centre métallique, on dit que le complexe subit une déformation tétragonale. En général, cette déformation n'est pas favorable car elle conduit à une perte d'énergie de liaison. Cependant, ce phénomène est favorisé dans certaines conditions décrites par le théorème de Jahn-Teller^{692,693}. Celui-ci établit que :

"pour une molécule non linéaire dans un état électroniquement dégénéré, une déformation peut se produire pour diminuer la symétrie, lever la dégénérescence et abaisser l'énergie".

La description orbitale permet de mieux comprendre la nature fondamentale de l'effet Jahn-Teller. Ainsi, dans le cas où deux ligands situés le long de l'axe z d'un complexe octaédrique s'éloignent du métal central, ils réduisent leur interaction avec les orbitales d possédant une composante z , c'est-à-dire la d_{z^2} , la d_{xz} et la d_{yz} . Ces orbitales sont donc stabilisées. Par contre, pour garder l'énergie moyenne de l'ensemble des orbitales d constantes, les orbitales sans composante z , la $d_{x^2-y^2}$ et la d_{xy} , voient leur énergie augmenter d'une quantité proportionnelle.

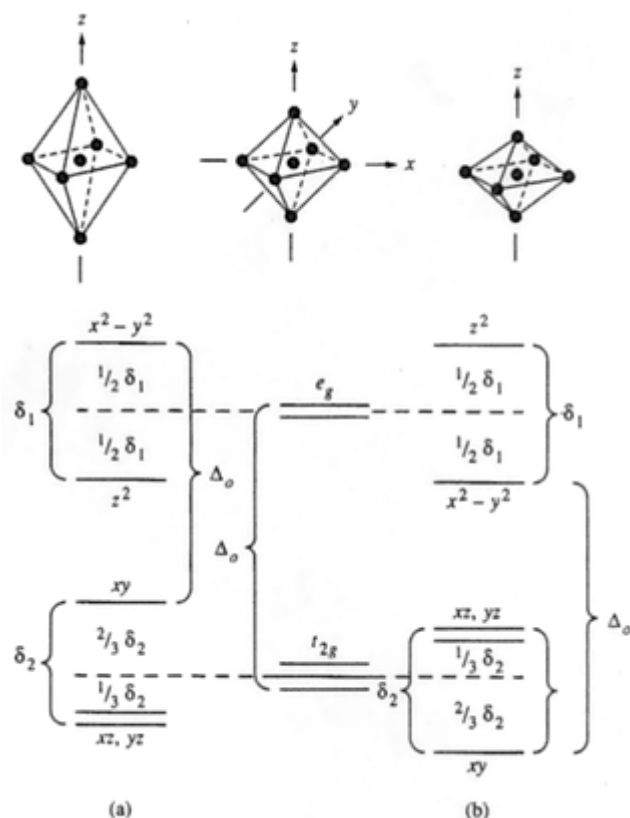


Figure 1.27. Altération des énergies des orbitales d d'un complexe octaédrique (au centre) lors d'une déformation tétragonale. (a) Eloignement des ligands suivant z ; (b) Rapprochement des ligands suivant z ⁶⁸⁸.

Il n'est pas possible, a priori, de prédire l'ampleur de ces dédoublements, car on ne peut pas prévoir l'importance ou le type de déformation qui se produira : les ligands situés le long de l'axe z peuvent tout aussi bien se rapprocher du centre métallique que s'en éloigner. Dans le cas d'une déformation de compression suivant z , le schéma de dédoublement est similaire à celui observé pour une déformation d'élongation suivant z , mais l'ordre des énergies des niveaux e_g et t_{2g} est inversé (Figure 1.27.).

Pour observer une déformation tétragonale, le centre métallique impliqué dans la complexation doit être caractérisé par une configuration électronique particulière : les orbitales e_g ou t_{2g} doivent être occupées de manière asymétrique par les électrons. Ainsi, l'effet Jahn-Teller s'applique particulièrement bien aux complexes au cuivre (II), possédant une configuration électronique en d^9 (Figure 1.28.). La levée de dégénérescence observée lors d'une déformation tétragonale au sein de ces complexes est en effet favorisée : le dédoublement des orbitales e_g provoque la stabilisation de deux électrons pour un électron déstabilisé.

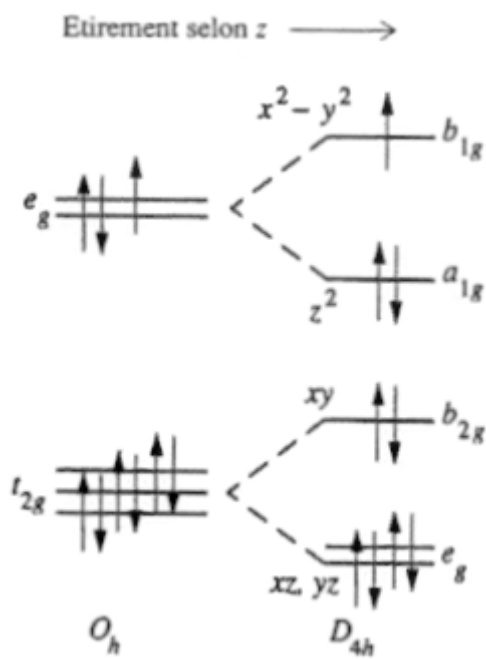


Figure 1.28. Levée de dégénérescence des orbitales d lors de la déformation tétragonale d'élongation suivant z dans un complexe au cuivre (II) de configuration électronique d^9 ⁶⁸⁸.

Expérimentalement, on constate que ce sont surtout les déformations d'élongation qui affectent les complexes au cuivre (II). L'ion cuivrique favorise d'ailleurs des géométries allant de l'octaèdre au plan carré, en passant par la configuration pyramidale à base carrée, suivant la présence de respectivement six, quatre ou cinq ligands⁶⁹⁴. A la lumière du théorème de Jahn-Teller, les deux dernières géométries peuvent être considérées comme des formes limites d'octaèdres déformés tétragonalement, un des deux ligands apicaux, ou les deux, se situant à une distance du centre métallique trop importante pour permettre encore une liaison.

La structure cristallographique du complexe **C01-XOSNUO** illustre bien ce phénomène. Ce complexe à cinq coordinations est caractérisé par une géométrie pyramidale à base carrée. Un perchlorate peut cependant être observé dans l'axe de la pyramide, mais il est trop éloigné du cuivre (3.223 Å) pour être considéré comme un sixième ligand.

A l'origine, le théorème de Jahn-Teller s'appliquait à l'approche de six ligands identiques autour de l'ion métallique central. Il peut cependant être généralisé aux complexes possédant des ligands différents, la nature du ligand ayant moins d'influence sur le phénomène de dégénérescence orbitalaire que la configuration électronique du métal⁶⁹¹. On peut donc expliquer les déformations tétragonales d'élongation observées dans les structures cristallographiques des complexes **C0-C4** par cet effet Jahn-Teller.

1.2 Les relations entre la structure et l'activité des complexes C0-C4, tentative de rationalisation de l'interaction inhibiteur/protéase

Les études de diffraction des rayons X décrites au point précédent montrent que les complexes formés à l'état cristallin à partir des ligands **L0-L4** adoptent une géométrie tout à fait différente de celle du composé chef de file SETCEZ. On observe en particulier au sein des complexes **C02**, **C1**, **C2** et **C4**, soit une symétrie axiale C_2 , soit une agencement centrosymétrique. Cette nouvelle organisation spatiale est susceptible de correspondre à celle des sous-sites S1/S1' et S2/S2' disposé au sein du site actif de la protéase selon une symétrie C_2 . On pourrait ainsi expliquer l'important gain d'activité inhibitrice de certains de ces complexes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris un travail de modélisation moléculaire.

... les modèles d'interaction basés sur la structure cristallographique

Les complexes **C0-C4** sont, en solution, caractérisés par différentes activités biologiques. Ainsi, si les composés **C1**, **C2**, et **C3** possèdent un pouvoir inhibiteur non négligeable, avec des IC_{50} de l'ordre du micromolaire, **C01** et **C02** sont inactifs et **C4** est instable dans les conditions du test enzymatique. Sur base des informations structurales issues de la cristallographie, il est intéressant de rationaliser l'ensemble des résultats obtenus.

La structure des différents complexes cristallisés est représentée schématiquement aux figures 1.29. et 1.30. Chacun d'eux est formé à partir de deux ligands organiques principaux s'organisant autour d'un seul ion cuivrique. On peut cependant les classer en deux catégories suivant le mode de chélation observé. D'une part, le complexe **C01** possède un ligand tridentate chélatant le cuivre d'une manière semblable à celle de SETCEZ. Le second ligand est, quant à lui, bidentate (Figure 1.29.). D'autre part, les complexes **C02**, **C1**, **C2** et **C4** sont caractérisés par deux ligands bidentates symétriques formant un plan autour du cuivre (II). De part et d'autre de ce plan, des molécules de solvant ou des contre-ions assurent les coordinations en positions apicales (Figure 1.30.).

Les paragraphes suivants sont consacrés à l'élaboration d'hypothèses d'interaction entre ces complexes et la protéase du VIH-1. Elles serviront de point de départ à une étude de modélisation moléculaire des inhibiteurs au sein du site actif de la protéase.

Le complexe **C01** est inactif (Figure 1.29.). Un de ses ligands adopte pourtant le mode de complexation de SETCEZ, la molécule chef de file de cette étude qui possède, quant à elle, une faible activité biologique. Cependant, rappelons-nous que le modèle d'interaction élaboré pour SETCEZ contient deux éléments clés du pharmacophore de base (voir le chapitre 3 de l'introduction générale) : d'une part, la complexation de la molécule d'eau catalytique par l'ion cuivrique, et d'autre part, l'assimilation sous forme des deux fonctions carbonyles d'une molécule d'eau structurale servant de relais entre les flaps de l'enzyme et les inhibiteurs peptidomimétiques classiques. Si cette deuxième interaction peut être conservée avec **C01**, puisqu'une fonction carbonyle est toujours disponible, un deuxième ligand bidentate occupe la place de la molécule d'eau catalytique. Celle-ci entraîne une gêne stérique considérable, à laquelle on peut attribuer la perte d'affinité observée. Ce second ligand chélate le cuivre (II) *via* un de ses azotes pyridiniques (liaison courte) et, en position apicale, *via* l'oxygène amidique. Cette deuxième liaison, plus longue, est sans doute plus labile. On peut se demander si ce deuxième ligand bidentate subsisterait en solution. Dans le cas contraire, on se retrouverait face à une molécule fort semblable à SETCEZ, mais ne possédant qu'une seule fonction carbonyle. L'absence d'une fonction carbonyle pourrait, elle aussi, entraîner la perte d'interactions favorables avec la protéase et dès lors être responsable de l'inactivité de **C01**.

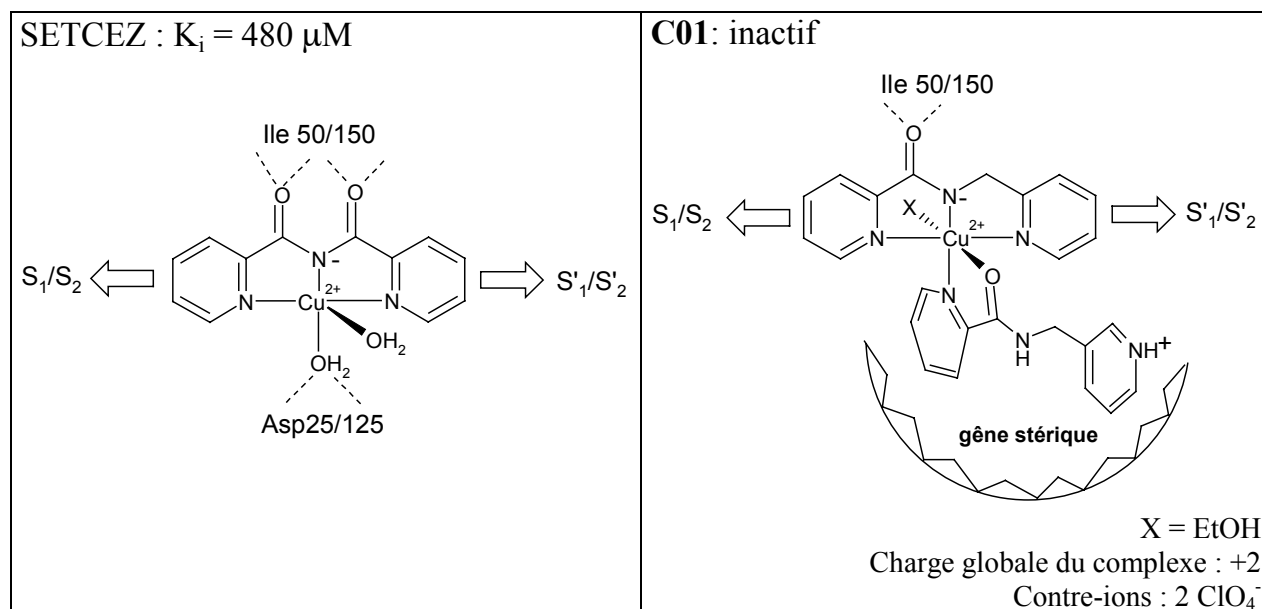


Figure 1.29. Structure cristallographique de **C01** comparée à celle de SETCEZ. En postulant un même mode d'interaction avec la protéase, le second ligand bidentate de **C01** générerait une gêne stérique défavorable au niveau des aspartates catalytiques.

Les complexes **C02**, **C1**, **C2** et **C4** présentent de prime abord une structure significativement différente de celle de SETCEZ, le chef de file de cette étude. La géométrie adoptée par les deux ligands bidentates s'organisant symétriquement autour du cuivre (II), détermine une structure relativement plane dont les groupements organiques indiquent quatre directions opposées deux à deux. Lorsque l'on considère la topologie du site actif de la protéase du VIH-1, on remarque que les différents sous-sites S_{1-2}/S'_{1-2} sont disposés selon un agencement similaire. On peut dès lors postuler que la géométrie de ces complexes leur permettra d'orienter leurs groupements hydrophobes P_{1-2}/P'_{1-2} dans les directions des sous-sites S_{1-2}/S'_{1-2} (Figure 1.30.).

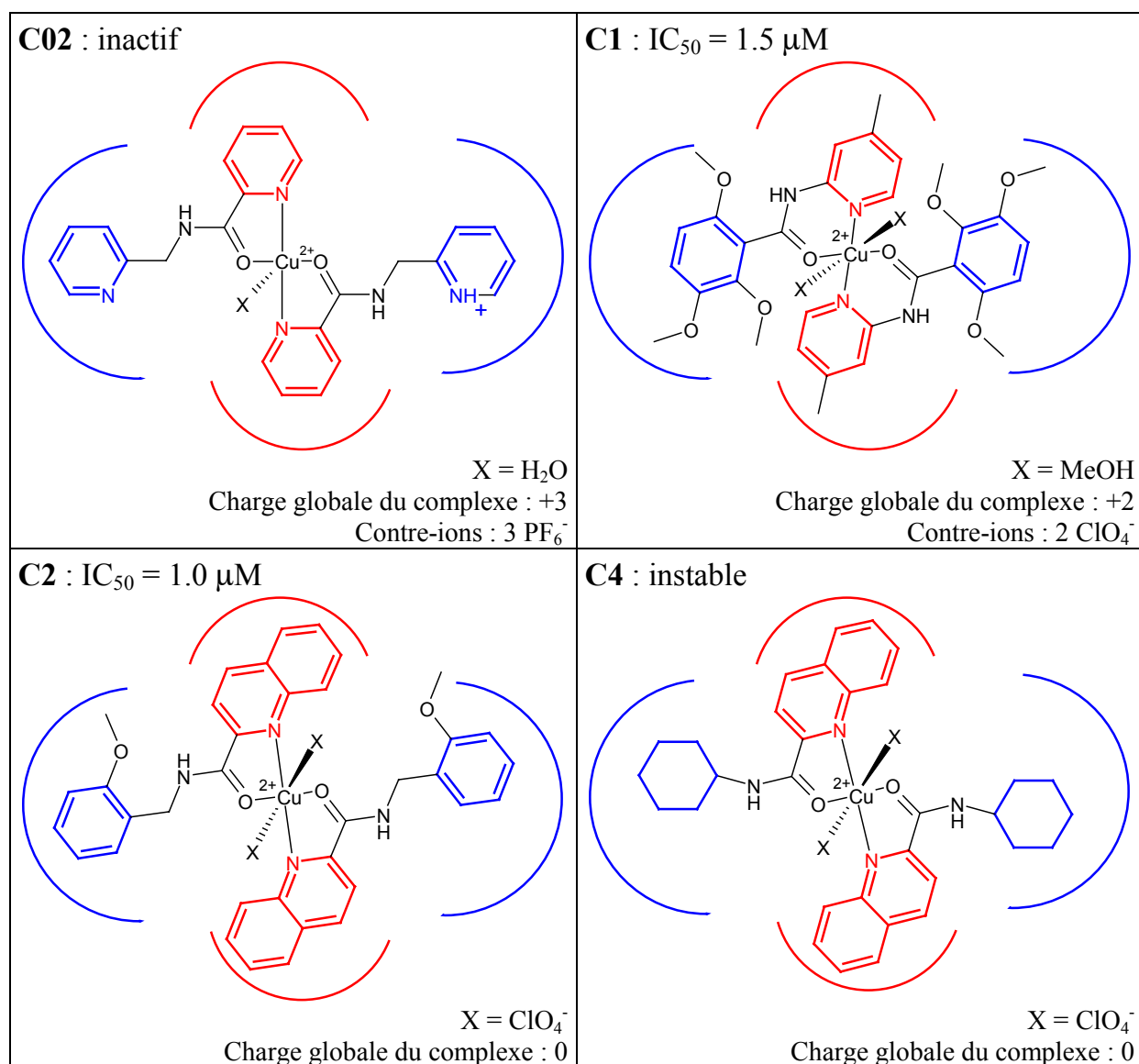


Figure 1.30. Structure cristallographique des complexes **C02**, **C1**, **C2** et **C4**. Les sous-sites $S1/S1'$ ou $S2/S2'$ de la protéase sont représentés par des arcs de cercle bleus ou rouges ; y correspondraient les groupements principaux des ligands organiques.

De part et d'autre de ce plan central, les coordinations axiales permettent de reformer les interactions clés du pharmacophore initial avec, d'une part, les résidus catalytiques, et d'autre part, les flaps de l'enzyme. Ces positions apicales subissent une déformation d'élongation due à l'effet Jahn-Teller. Elles sont ainsi plus labiles et il est fort probable qu'en milieu aqueux, les molécules de méthanol ou les ions perchlorate qui se trouvent au sein d'un cristal, soient échangées par des molécules d'eau. On retrouverait, dans ce cas, la molécule d'eau catalytique directement complexée à l'ion cuivrique. De l'autre côté de l'ion métallique, une seconde molécule d'eau pourrait interagir avec les flaps. On peut assimiler celle-ci à la molécule d'eau structurale présente dans la plupart des complexes inhibiteurs peptidomimétiques/protéase. Cependant, il faut remarquer ici que la coordination de cette molécule d'eau par le cuivre (II) la contraint à adopter une orientation légèrement différente. De plus, seul un doublet de l'oxygène est disponible comme accepteur de proton puisque l'autre sert à la complexation du métal. Il est donc possible qu'une partie des interactions formées avec l'enzyme à ce niveau soit perdue (Figure 1.32.).

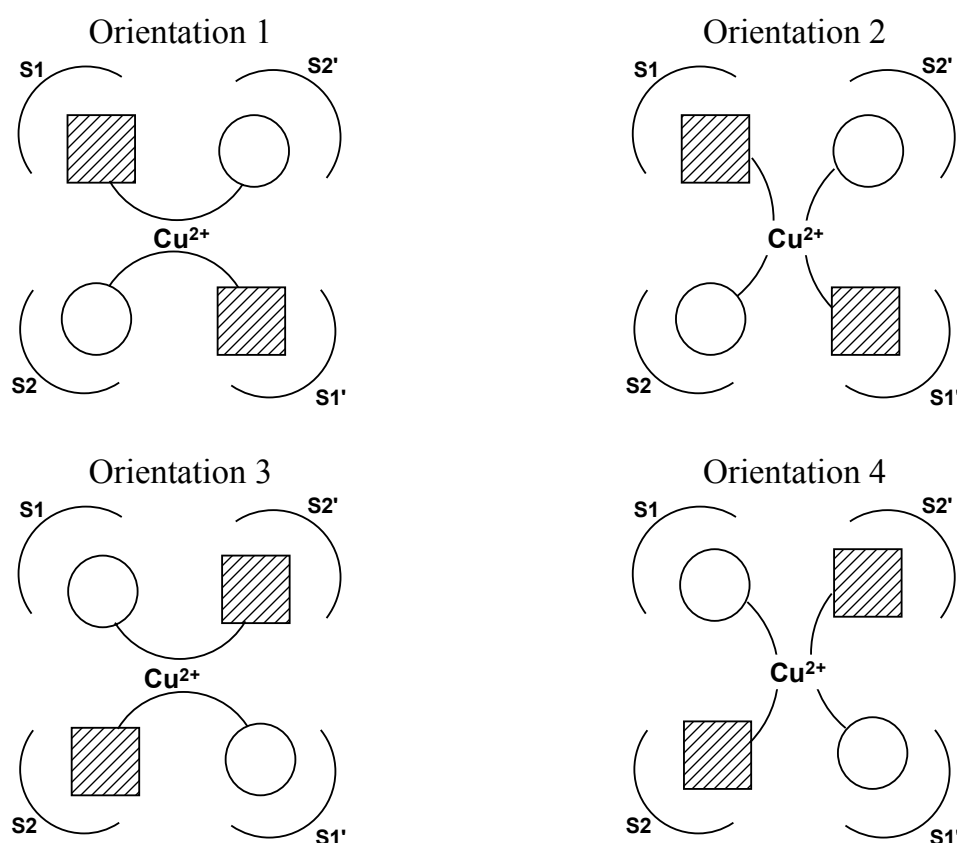


Figure 1.31. Représentation schématique des quatre orientations que peuvent adopter les complexes C02, C1, C2 et C4 au sein du site actif de la protéase. Chaque ligand organique est composé de deux groupements principaux symbolisés par un carré hachuré et par un cercle reliés par un arc de cercle.

Nous avons posé l'hypothèse que le pouvoir inhibiteur des complexes **C1** et **C2** résulterait d'une correspondance adéquate entre les quatre groupements principaux apparaissant dans nos composés et les poches S_{1-2}/S'_{1-2} du site actif de la protéase. Dans ce cas, quatre orientations sont possibles puisque chaque groupement peut occuper un sous-site différent (Figure 1.31.). Les molécules d'eau vraisemblablement présentes en positions apicales pouvant interagir au niveau des flaps et des aspartates catalytiques, la continuité du pharmacophore initial, décrit dans le chapitre 3 de l'introduction générale, serait ainsi assurée (Figure 1.32.).

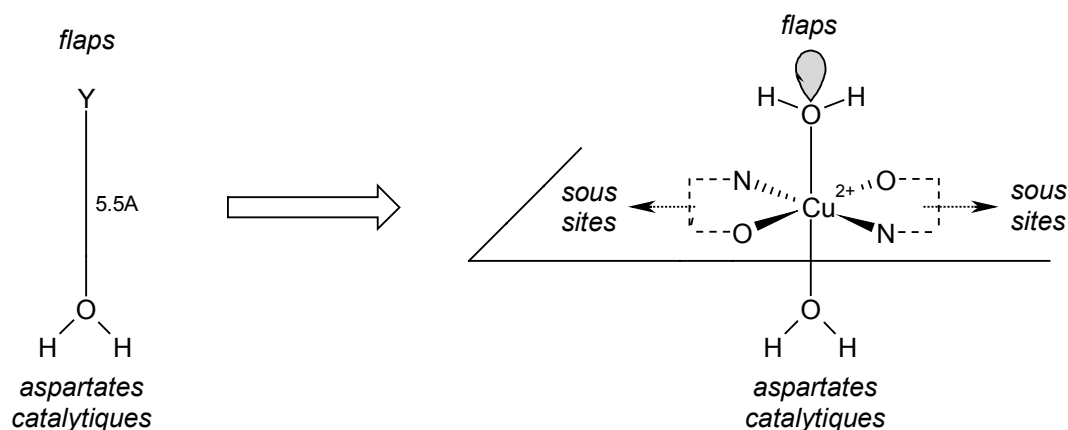


Figure 1.32. Représentation schématique du mode d'interaction postulé des complexes avec la protéase. On retrouve les éléments du pharmacophore initial : la molécule d'eau catalytique ainsi que l'accepteur de proton Y permettant l'interaction avec les flaps de l'enzyme. Ce rôle pourrait être assuré par une deuxième molécule d'eau complexée au cuivre central. Notons ici que seul un doublet libre de l'oxygène, représenté en gris, est susceptible de jouer le rôle d'accepteur de proton.

La géométrie adoptée par **C02** et **C4** permet également d'organiser correctement les groupements organiques dans les directions des différents sous-sites, les coordinations apicales étant par ailleurs disponibles pour former les autres interactions clés du pharmacophore. Sous leur forme adoptée à l'état cristallin, **C02** et **C4** devraient donc remplir des critères d'activité antienzymatique assez semblables à ceux de **C1** et **C2**. **C02** est cependant inactif, tandis que **C4** présente une instabilité dans les milieux biologiques utilisés lors des tests enzymatiques. A ce niveau de notre étude, il est donc hasardeux d'émettre des hypothèses quant aux relations unissant leur structure et leur (in)activité.

C3 : $IC_{50} = 2\mu M$

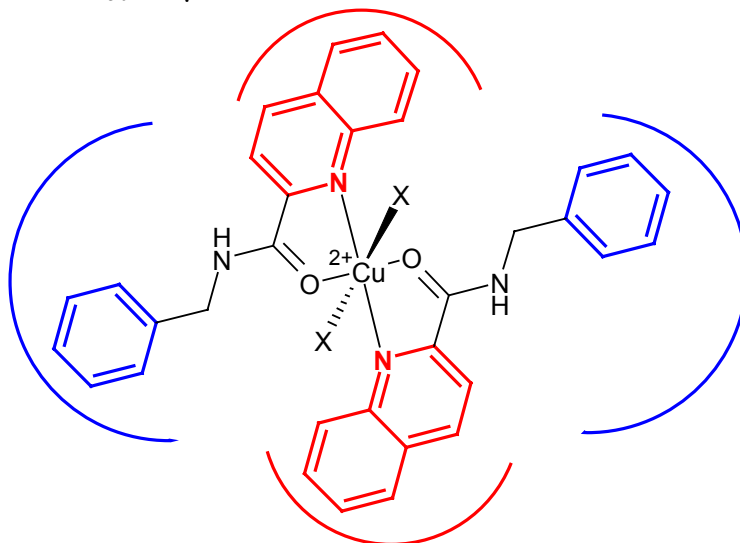


Figure 1.33. Structure postulée du complexe **C3**. Les sous-sites S1/S1' ou S2/S2' de la protéase sont représentés par des arcs de cercle bleus ou rouges ; y correspondraient les groupements principaux des ligands **L3**.

Enfin, le complexe **C3** présente une activité antienzymatique similaire à celle de **C1** et **C2**. Les expériences de cristallographie n'ont cependant pas permis d'isoler ce composé sous forme de complexe à l'état cristallin. On peut cependant penser qu'il se complexerait suivant le même mode que celui de **C2**, leurs ligands organiques étant très semblables, à un groupement méthoxy près. **C3** interagirait dès lors avec la protéase d'une manière analogue à **C2** (Figure 1.33.).

Les hypothèses posées pour expliquer l'affinité des différents complexes vis-à-vis de la protéase du VIH-1 peuvent être étayées par une étude de modélisation moléculaire au sein du site actif de l'enzyme.

... la modélisation moléculaire des complexes **C0-C4**/protéase

Nous avons posé l'hypothèse que la géométrie adoptée par les trois complexes métallo-organiques actifs **C1**, **C2**, et **C3** leur permettait d'atteindre à la fois les sous-sites S1/S1' et S2/S2' tout en gardant des interactions favorables avec les aspartates catalytiques et les flaps de l'enzyme. Cette structuration pourrait, dès lors, expliquer leur pouvoir inhibiteur intéressant. Pour explorer cette voie, nous avons modélisé ces complexes au sein du site actif de la protéase par mécanique moléculaire, en remplaçant les molécules de méthanol ou les perchlorates se trouvant en positions apicales par des molécules d'eau.

Par ailleurs, les complexes **C01** et **C02** sont inactifs. Si la géométrie adoptée par **C01** provoque un encombrement stérique évident et l'empêche ainsi de s'insérer dans le site actif de l'enzyme, le cas de **C02** est plus ambigu puisque l'organisation des ligands autour du centre métallique est fort semblable à celle de **C2**. La structure de **C4**, un complexe très proche de **C2**, a également été analysée par cristallographie mais l'activité de ce complexe n'a pu être déterminée en raison d'une instabilité dans les milieux biologiques utilisés lors des tests enzymatiques. Afin de clarifier le comportement de **C02** et de **C4** vis-à-vis de la protéase, nous avons inclus ces composés dans notre étude de modélisation moléculaire.

L'insertion des composés **C02**, **C1**, **C2**, **C3** et **C4** au sein du site actif de la protéase a été réalisée en les alignant manuellement sur l'inhibiteur A74704⁶⁹⁵ (Tableau 1.28.) dont la structure cocrystallisée avec l'enzyme est disponible dans la banque de données de Brookhaven, PDB (Protein Data Base), sous le nom de code 9hvp*. Les quatre orientations possibles dans les différents sous-sites enzymatiques reprises à la figure 1.31 ont été envisagées pour chaque complexe métallo-organiques.

Une fois les structures des composés **C02-C4** positionnées manuellement au sein du site actif, les complexes ainsi formés ont été soumis à une minimisation de leur énergie potentielle par le champ de force ESFF, qui couvre la totalité des éléments du tableau périodique, à l'aide des algorithmes '*steepest descent*' et '*conjugate gradients*'. Ce champ de forces n'a pas spécialement été développé pour l'étude de macromolécules telles que les protéines, mais est plutôt présenté comme champ de forces universel. Son utilisation lors de la modélisation de SETCEZ a cependant

* Lors des travaux antérieurs sur lesquels s'appuie ce travail de thèse, la protéase issue du complexe enzyme/ligand 9hvp a été utilisée pour modéliser les interactions avec le chef de file SETCEZ. Dans cette optique, le complexe 9hvp a été soumis à un processus de relaxation indispensable pour éliminer les tensions dues à la résolution cristallographique^{483,699}.

permis de pointer les interactions clés entre l'enzyme et l'inhibiteur⁴⁸³. Dès lors, de façon similaire au protocole utilisé lors de cette modélisation, la protéase a été figée dans sa structure cristalline relaxée, en ne permettant qu'aux chaînes latérales de résidus du site actif et à l'inhibiteur de changer de conformation. Une seconde minimisation a ensuite été entreprise, en autorisant cette fois le déplacement des chaînes principales des résidus du site actif moyennant l'application de contraintes dégressives de 20, 10 et 0 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. A chaque étape, un seuil de convergence requis a été fixé à 0.01 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. Pour rendre compte des effets du solvant, nous avons choisi une constante diélectrique dépendant de la distance entre espèces chargées. Un "cut off" de 12 Å a également été fixé de façon à effectuer les calculs dans un laps de temps raisonnable.

I. Modélisation du complexe C1/protéase

Dans les deux premières orientations, les groupements triméthoxyphényle de **C1**, symbolisés à la figure 1.31. par des carrés hachurés, s'insèrent dans les poches S1/S1', tandis que les groupements pyridines, symbolisés par des cercles, occupent les sous-sites S2/S2'. Ces deux orientations diffèrent par la position relative des deux ligands **L1** complexant l'ion cuivrique central. A l'inverse, dans les orientations 3 et 4, ce sont les groupements pyridiniques qui occupent les poches S1/S1', tandis que les triméthoxyphényles se positionnent au sein des sous-sites S2/S2'.

Les énergies d'interaction entre la protéase et les complexes métallo-organiques ont été relevées de façon à mettre en évidence l'orientation la plus favorable. Le tableau 1.18 reprend l'énergie potentielle d'interaction totale, $E_{\text{pot,tot}}$, de même que les contributions de van der Waals, $E_{\text{pot,vdw}}$, et de Coulomb, $E_{\text{pot,cb}}$.

Tableau 1.18. Energie d'interaction entre **C1** et la protéase du VIH-1.

	$E_{\text{pot,tot}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,vdw}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,cb}}$ [kcal/mol]
orientation 1	-100.2	-21.3	-78.9
orientation 2	-99.2	-17.6	-81.6
orientation 3	-97.6	-20.6	-77.0
orientation 4	-96.3	-19.5	-76.8

Lorsque l'on compare ces valeurs, il apparaît que les quatre orientations sont caractérisées par des énergies d'interaction relativement proches. Il est dès lors assez difficile, sur cette base, de discriminer l'orientation la plus favorable, dans laquelle **C1** effectuerait un plus grand nombre de contacts de van der Waals et/ou d'interaction de Coulomb, traduisant une situation plus stable et donc plus probable. L'examen des interactions formées dans chaque conformation, et plus particulièrement le relevé des différents ponts hydrogène formés après minimisation (Tableau 1.19) plaide plutôt en faveur de la première orientation, dans laquelle les groupements triméthoxyphényliques et pyridiniques s'insèrent respectivement dans les poches S1/S1' et S2/S2'.

Tableau 1.19. Ponts hydrogène formés entre **C1** et la protéase après minimisation dans chaque orientation (symétrie #1 : -x+2, -y+1, -z+1).

	Asp 25	Asp 125	Ile 50	Gly 48	Arg 108
orient. 1	H(H ₂ O) 1.69 Å	H(H ₂ O) 1.65 Å 1.96 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 2.14 Å		O(22) ^{#1} 2.04 Å O(20) ^{#1} 1.76 Å
orient. 2	H(H ₂ O) 1.68 Å	H(H ₂ O) 1.65 Å NH(9) 1.80 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 2.01 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.58 Å	
orient. 3	H(H ₂ O) 1.67 Å	H(H ₂ O) 1.64 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.71 Å	
orient. 4	H(H ₂ O) 1.63 Å	H(H ₂ O) 1.71 Å 1.90 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.97 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.71 Å	

Il est intéressant de noter que dans les quatre orientations, la plupart des ponts hydrogène recensés impliquent les molécules d'eau en position apicale. En effet, la distance mesurée entre les oxygènes des deux molécules d'eau apicales ($d = 5.4$ Å) correspond aux critères pharmacophoriques établis précédemment. Celles-ci jouent donc de manière adéquate leur rôle d'intermédiaires non seulement entre l'inhibiteur et les résidus catalytiques, comme le prévoyait le pharmacophore initial, mais également entre l'inhibiteur et certains résidus des flaps de l'enzyme. Dans ce cas, le seul doublet accessible de la molécule d'eau est, comme prévu, accepteur de proton en formant un pont hydrogène avec l'isoleucine 50. La perte d'interaction due au deuxième doublet de l'oxygène est cependant compensée dans les orientations 2, 3 et 4, par la possibilité

qu'à la molécule d'eau d'également jouer le rôle de donneur de proton, en interagissant, par exemple, avec l'oxygène amidique de la glycine 48.

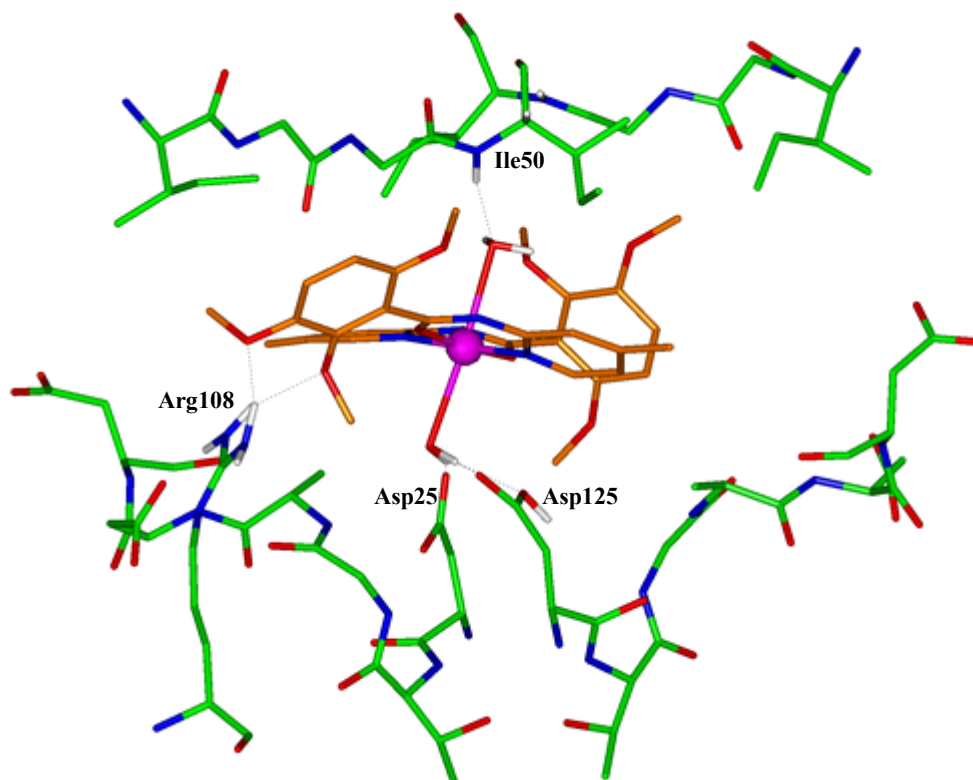


Figure 1.34. Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C1** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : C_{C1}: orange ; C_{PR}: vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

Dans l'orientation 1, on observe également des ponts hydrogène entre les oxygènes d'un des triméthoxyphényles et les protons de l'arginine 108 (Figure 1.34.). Ce type d'interaction entre un des ligands organiques **L1** et les résidus du site actif de la protéase n'est pas retrouvé dans les autres orientations. Il est, en outre, important de cibler cette arginine 108 lors de la conception d'inhibiteurs adaptés aux souches mutantes du virus. En effet, des études statistiques montrent que tout comme les aspartates catalytiques 25/125, les arginines 8/108 ne sont jamais mutées, que ce soit en présence ou pas d'inhibiteur⁹⁰.

II. Modélisation du complexe C2/protéase

Dans les deux premières orientations, les groupements méthoxybenzyle de **C2**, symbolisés à la figure 1.31. par des carrés hachurés, s'insèrent dans les poches S1/S1', tandis que les groupements quinoléine, symbolisés par des cercles, occupent les sous-sites S2/S2'. Ces deux orientations diffèrent par la position relative des deux ligands **L2** complexant l'ion cuivrique central. A l'inverse, dans les orientations 3 et 4, ce sont les quinoléines qui occupent les poches S1/S1', tandis que les méthoxybenzyles se positionnent au sein des sous-sites S2/S2'.

L'analyse des énergies d'interaction, reprises dans le tableau 1.20., montre que l'orientation 4, dans laquelle les quinoléines de **C2** occupent les sous-sites S1/S1' est favorisée, principalement grâce à une contribution coulombienne élevée. En effet, il se forme dans cette configuration un nombre élevé de ponts hydrogène repris dans le tableau 1.21 et illustrés à la figure 1.35.

Tableau 1.20. Energie d'interaction entre **C2** et la protéase du VIH-1.

	$E_{\text{pot,tot}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,vdw}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,cb}}$ [kcal/mol]
orientation 1	-70.9	-23.0	-47.9
orientation 2	-73.1	-23.6	-49.5
orientation 3	-69.5	-26.0	-43.5
orientation 4	-78.1	-21.8	-56.3

Les ponts hydrogène formés entre l'inhibiteur **C2** et la protéase impliquent dans chaque orientation les molécules d'eau en position apicale. **C2** interagit donc, lui aussi, aussi bien avec les résidus catalytiques qu'avec les résidus des flaps de l'enzyme, en accord avec les critères établis dans le pharmacophore initial.

Dans l'orientation 4, on recense six ponts hydrogène formés entre **C2** et la protéase. On retrouve bien sûr les interactions clés avec les aspartates catalytiques, mais également avec les glycines 48, 127 et 149. Ces deux derniers acides aminés sont conservés, quelle que soit la souche virale étudiée⁹⁰.

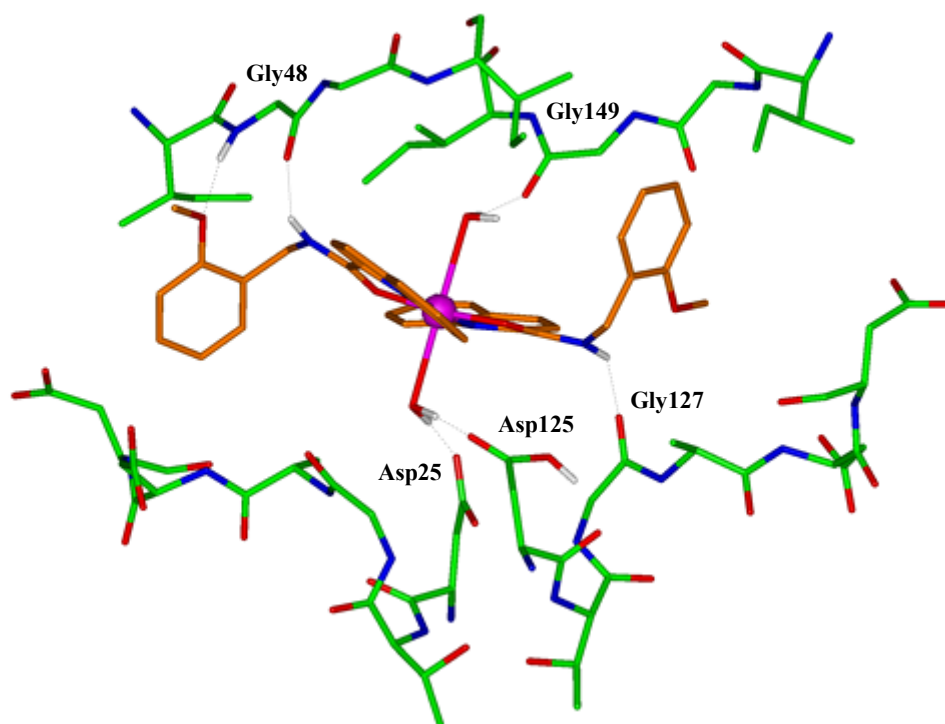


Figure 1.35. : Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C2** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : C_{C2} : orange ; C_{PR} : vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

Tableau 1.21. : Ponts hydrogène formés entre **C2** et la protéase après minimisation dans chaque orientation (symétrie #1 : $-x+2, -y, -z+2$).

	Arg108	Asp25	Asp125	Gly127	Gly48	Gly149	Ile 50
orient. 1	O(22) ^{#1} 1.74 Å	H(H ₂ O) 1.54 Å	H(H ₂ O) 1.62 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.62 Å		
orient. 2	O(22) 1.86 Å	H(H ₂ O) 1.53 Å	H(H ₂ O) 1.64 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.63 Å	NH(14) 1.77 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.93 Å
orient. 3		H(H ₂ O) 1.54 Å	H(H ₂ O) 1.60 Å			H(H ₂ O) ^{#1} 1.63 Å	
orient. 4		H(H ₂ O) 1.54 Å	H(H ₂ O) 1.61 Å	NH(14) 1.83 Å	O(22) 1.88 Å NH(14) 1.76 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.62 Å	

III. Modélisation du complexe C3/protéase

La structure du complexe **C3** n'a pu être déterminée par cristallographie. Dès lors, nous avons construit **C3** à partir du complexe **C2**, dont les ligands constitutifs ne diffèrent que par la présence additionnelle d'un groupement méthoxy substituant le benzyle. Le complexe postulé **C3** (Figure 1.33.) a ensuite été inséré dans le site actif de la protéase et soumis à une procédure de minimisation selon la méthodologie décrite précédemment.

Les quatre orientations habituelles ont été envisagées. Similairement à **C2**, dans les deux premières orientations, on retrouve respectivement dans les sous-sites S1/S1' et S2/S2', les groupements benzyliques et quinoléiques, représentés à la figure 1.31. par des carrés hachurés et des cercles. Ces deux orientations diffèrent par le position relative des deux ligands **L3** complexant l'ion cuivrique central. A l'inverse, dans les orientations 3 et 4, ce sont les quinoléines qui occupent les poches S1/S1', tandis que les benzyles se positionnent au sein des sous-sites S2/S2'.

Les énergies d'interactions (Tableau 1.22.) des orientations 1 et 4 sont relativement proches, l'énergie de la quatrième orientation étant légèrement plus favorable.

Tableau 1.22. Energie d'interaction entre **C3** et la protéase du VIH-1.

	$E_{\text{pot,tot}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,vdw}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,cb}}$ [kcal/mol]
orientation 1	-76.5	-22.6	-53.9
orientation 2	-74.5	-21.3	-53.2
orientation 3	-66.5	-23.1	-43.2
orientation 4	-78.6	-22.5	-56.1

Le relevé des ponts hydrogène dans chaque orientation se trouve dans le tableau 1.23. L'examen des différents complexes **C3**/protéase obtenus après minimisation montre que l'orientation 4 permet de former des ponts hydrogène non seulement avec les résidus catalytiques 25/125 et avec les résidus des flaps *via* les molécules d'eau complexant l'ion cuivrique en position apicale, mais également avec d'autres acides aminés du site actif de la protéase : les glycines 48 et 127. Ces dernières interactions se font par l'intermédiaire de l'azote amidique de chaque ligand organique **L3**. On retrouve également l'implication de ces azotes amidique dans des ponts hydrogène

formés entre **C2** et la protéase. Ils semblent, dès lors, importants pour renforcer l'interaction avec l'enzyme.

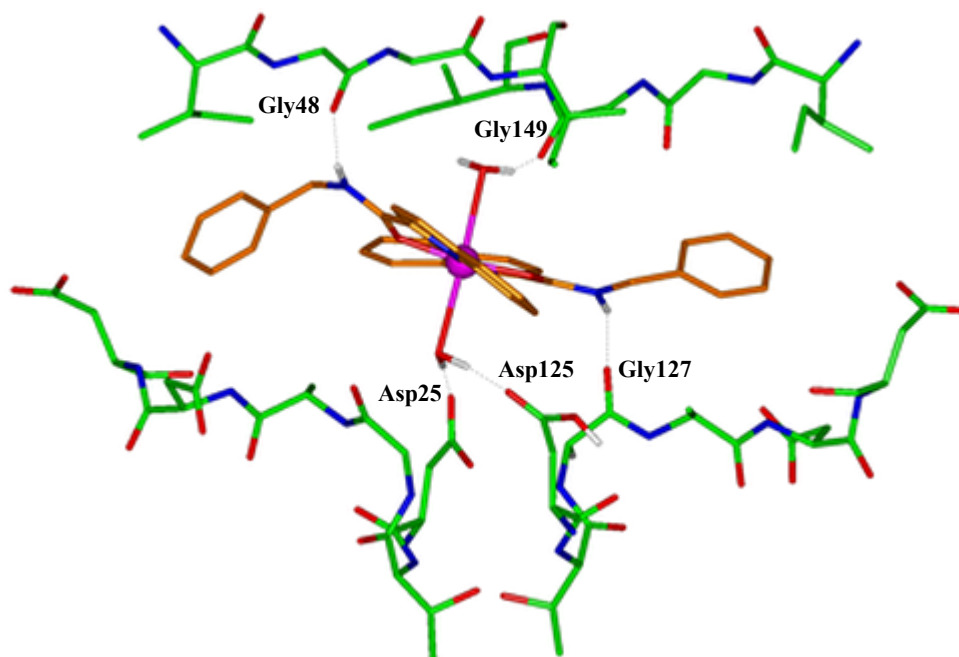


Figure 1.36. Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C3** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1, dans l'orientation 4. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : C_{C3}: orange ; C_{PR}: vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

Tableau 1.23. Ponts hydrogène formés entre **C3** et la protéase après minimisation dans chaque orientation.

	Asp25	Asp125	Gly27	Gly127	Gly48	Gly149	Ile50
orient. 1	H(H ₂ O) 1.55 Å	H(H ₂ O) 1.66 Å			H(H ₂ O) ^{#1} 1.59 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.63 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.92 Å
orient. 2	H(H ₂ O) 1.53 Å	H(H ₂ O) 1.66 Å	NH(13) 1.82 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.64 Å	NH(13) 1.73 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.97 Å
orient. 3	H(H ₂ O) 1.53 Å	H(H ₂ O) 1.60 Å				H(H ₂ O) ^{#1} 1.63 Å	
orient. 4	H(H ₂ O) 1.54 Å	H(H ₂ O) 1.60 Å		NH(13) 1.80 Å	NH(13) 1.75 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.60 Å	

Si la première orientation est un peu moins favorisée d'un point de vue énergétique, elle permet cependant d'illustrer le rôle primordial dans l'interaction avec l'enzyme des molécules d'eau complexant le cuivre en position apicale (Figure 1.37.).

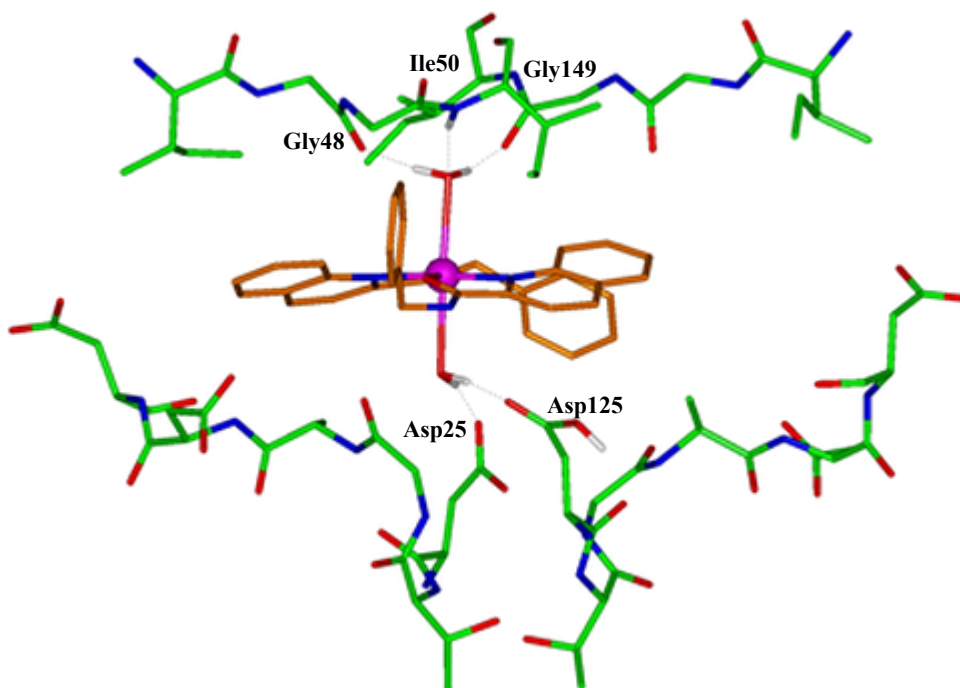


Figure 1.37. Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C3** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1 dans la première orientation. Les deux molécules d'eau complexant le cuivre en positions apicales sont parfaitement positionnées pour interagir avec l'enzyme. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : C_{C3}: orange ; C_{PR}: vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

D'une part, rappelons que le pharmacophore initial prévoyait d'incorporer au sein de l'inhibiteur la molécule d'eau catalytique. Elle se trouve ici parfaitement positionnée pour interagir avec les aspartates 25/125. D'autre part, ce pharmacophore comprenait un accepteur de proton mimant l'action de la molécule d'eau dite 'structurale' servant d'intermédiaire entre la plupart des inhibiteurs peptido-mimétiques classiques et les isoleucines 50/150 des flaps par la formation simultanée de quatre ponts hydrogène. La position de cette molécule d'eau structurale dans l'orientation 1 est très intéressante: elle est bien sûr directement complexée à l'ion cuivrique central mais est également reliée par trois ponts H avec différents résidus des flaps. On retrouve ainsi la quadruple interaction typique de cette molécule d'eau structurale. En outre, la distance entre les oxygènes de ces deux molécules d'eau est de 5.42 Å ce qui correspond tout à fait au critère géométrique ($5.5 \pm 0.5 \text{ Å}$) du pharmacophore sur lequel est basée cette étude.

IV. Modélisation du complexe C4/protéase

Le complexe **C4** présente une instabilité dans les tampons utilisés lors des tests biologiques. Son activité antiprotéolytique n'a donc pu être déterminée. A l'état cristallin, la structuration des deux ligands organiques **L4** autour de l'ion cuivrique central est cependant semblable à celle de **C2** qui fait preuve d'une activité inhibitrice non négligeable. Dès lors, il nous a semblé intéressant d'évaluer si une interaction entre **C4** et la protéase du VIH-1 était envisageable.

Selon le protocole habituel, **C4** a été inséré au sein du site actif de la protéase suivant quatre orientations puis soumis à une procédure de minimisation. Dans les deux premières orientations, les groupements cyclohexyliques, symbolisés à la figure 1.31. par des carrés hachurés se retrouvent dans les sous-sites S1/S'1, tandis que les quinoléines, symbolisées par des cercles, occupent les poches S2/S'2. Ces deux orientations diffèrent par la position relative des ligands **L4** par rapport au centre métallique. A l'inverse, les orientations 3 et 4 sont caractérisées par une occupation des poches S1/S'1 et S2/S'2 par, respectivement, les groupements quinoléiques et cyclohexyliques.

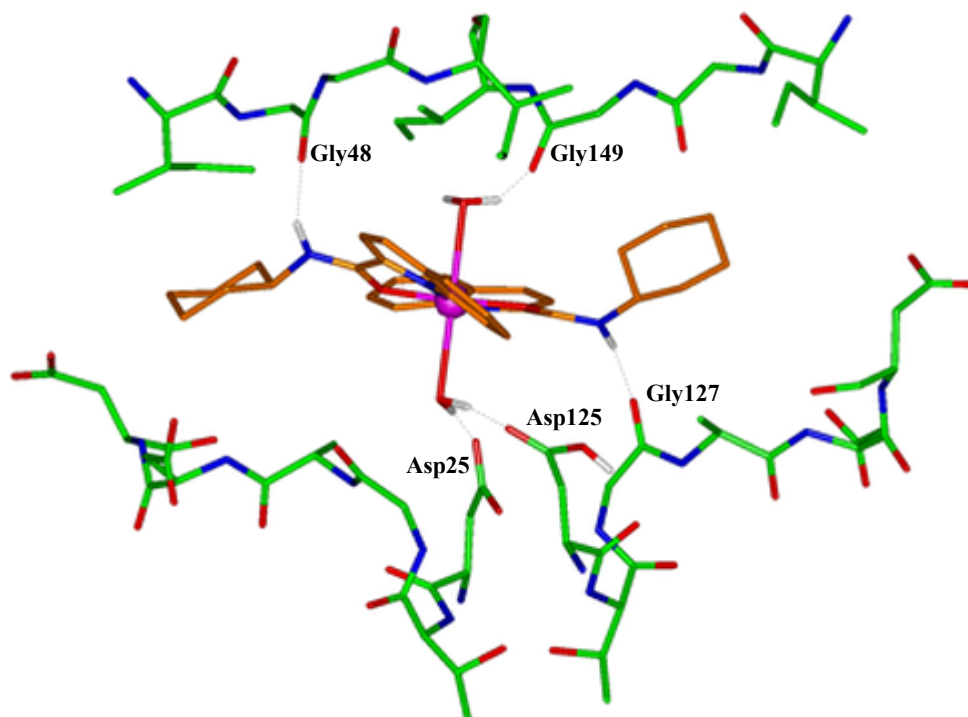


Figure 1.38. Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C4** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : C_{C4}: orange ; C_{PR}: vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

La manière dont **C4** interagit avec la protéase du VIH-1 est fort similaire à celle de **C2** et de **C3**. De nouveau, c'est l'orientation 4 reprise à la figure 1.38 qui est privilégiée sur le plan de l'énergie d'interaction (Tableau 1.24), suivie d'assez près par la première orientation. L'examen de la conformation adoptée par **C4** après minimisation au sein du site actif dans l'orientation 4 nous montre que cette conformation est favorisée par la formation de ponts hydrogène entre les molécules d'eau apicales et le site catalytique ou les flaps. Deux ponts H supplémentaires sont en outre formés avec les glycines 48 et 127 à partir de l'azote amidique de chaque ligand **L4**. Le relevé des ponts hydrogène formés dans chaque orientation est repris dans le tableau 1.25.

Tableau 1.24. Energie d'interaction entre **C4** et la protéase du VIH-1.

	$E_{\text{pot,tot}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,vdw}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,cb}}$ [kcal/mol]
orientation 1	-70.6	-21.9	-48.7
orientation 2	-63.8	-21.7	-42.1
orientation 3	-61.7	-23.1	-38.6
orientation 4	-73.6	-20.6	-53.0

Tableau 1.25. Ponts hydrogène formés entre **C4** et la protéase après minimisation dans chaque orientation.

	Asp25	Asp125	Gly27	Gly127	Gly48	Gly149	Ile 50
orient. 1	H(H ₂ O) 1.56 Å	H(H ₂ O) 1.72 Å			H(H ₂ O) ^{#1} 1.64 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.62 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.87 Å
orient. 2	H(H ₂ O) 1.59 Å	H(H ₂ O) 1.64 Å	NH(14) 1.74 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.66 Å		O(H ₂ O) ^{#1} 2.38 Å
orient. 3	H(H ₂ O) 1.56 Å	H(H ₂ O) 1.64 Å			H(H ₂ O) ^{#1} 1.58 Å		O(H ₂ O) ^{#1} 1.93 Å
orient. 4	H(H ₂ O) 1.55 Å	H(H ₂ O) 1.61 Å		NH(14) 1.73 Å	NH(14) 1.77 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.65 Å	

V. Modélisation du complexe C02/protéase

Le complexe **C02** est inactif. Il présente cependant des similarités structurales avec **C2** et pourrait donc s'insérer adéquatement dans le site actif de la protéase. Afin de vérifier si une interaction entre **C02** et l'enzyme est possible, une étude de modélisation moléculaire a été entreprise.

Quelques modifications ont été apportées à la structure cristallographique de **C02**. En effet, **C02** est caractérisé à l'état cristallin par une géométrie pyramidale à base carrée comportant 5 coordinations. Nous avons vu que ce type de géométrie peut être considéré comme un cas limite d'octaèdre déformé tétragonalement où un des ligands en position axiale s'écarte tant de l'ion cuivrique central qu'il ne peut plus être considéré comme lié à celui-ci. On peut, dès lors, imaginer que dans certaines conditions, cette sixième coordination peut être retrouvée. Nous avons donc ajouté une deuxième molécule d'eau en position apicale. Nous avons également considéré qu'à pH physiologique, les pyridines libres de **C02** étaient déprotonnées.

Lors de la procédure de minimisation, les quatre orientations habituelles ont été étudiées. Dans les deux premières, les groupements pyridiniques libres symbolisés à la figure 1.31. par des carrés hachurés se trouvent dans les sous-sites S1/S1', tandis que les pyridines impliquées dans la complexation et symbolisées par des cercles, sont localisées au sein des poches S2/S2'. De nouveau, ces deux orientations diffèrent par la position relative des ligands par rapport au centre métallique. A l'inverse, les deux dernières orientations sont caractérisées par une occupation des poches S1/S1' et S2/S2' par, respectivement, les pyridines impliquées dans la complexation et les pyridines libres.

Tableau 1.26. Energie d'interaction entre **C02** et la protéase du VIH-1.

	$E_{\text{pot,tot}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,vdw}}$ [kcal/mol]	$E_{\text{pot,cb}}$ [kcal/mol]
orientation 1	-71.4	-16.6	-54.8
orientation 2	-73.2	-14.2	-59.0
orientation 3	-63.7	-17.7	-46.0
orientation 4	-77.9	-14.4	-63.5

A l'image de l'interaction entre **C2** et la protéase, l'orientation 4 est la plus favorable sur le plan énergétique (Tableau 1.26.). On retrouve en effet dans cette configuration la formation de sept ponts hydrogène dont le relevé précis se trouve dans le tableau 1.27.

Tableau 1.27. Ponts hydrogène formés entre **C02** et la protéase après minimisation dans chaque orientation.

	Asp25	Asp125	Gly27	Gly48	Gly148	Gly149	Ile 50
orient. 1	H(H ₂ O) 1.53 Å	H(H ₂ O) 1.69 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.64 Å		H(H ₂ O) ^{#1} 1.59 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.91 Å
orient. 2	H(H ₂ O) 1.55 Å	H(H ₂ O) 1.71 Å	NH(10) 2.06 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.62 Å	NH(10) 1.82 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.57 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 2.04 Å
orient. 3	H(H ₂ O) 1.60 Å	H(H ₂ O) 1.53 Å				H(H ₂ O) ^{#1} 1.61 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 1.93 Å
orient. 4	H(H ₂ O) 1.55 Å	H(H ₂ O) 1.62 Å	NH(10) 2.01 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.64 Å	NH(10) 1.71 Å	H(H ₂ O) ^{#1} 1.59 Å	O(H ₂ O) ^{#1} 2.04 Å

L'examen de **C02** minimisé au sein du site actif de la protéase dans cette quatrième orientation (Figure 1.39.), nous permet d'observer que les molécules d'eau apicales sont localisées idéalement pour interagir avec les aspartates catalytiques et les flaps de l'enzyme. On retrouve également les ponts hydrogène entre les azotes amidiques protonés des deux ligands **L0** et les glycines 27 et 148 de la protéase.

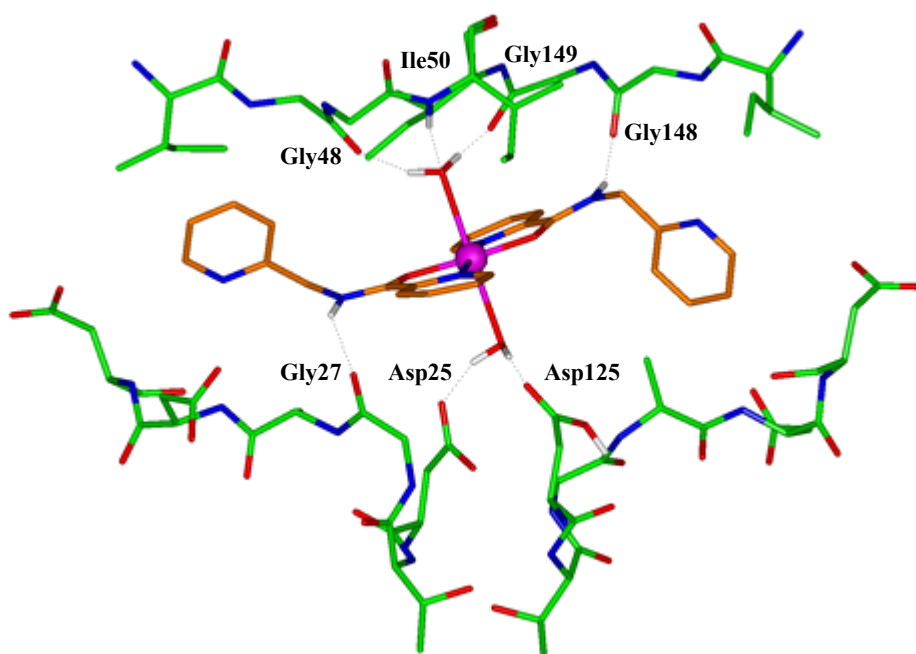


Figure 1.39. Interactions mises en jeu entre l'inhibiteur **C02** et les résidus du site actif de la protéase du VIH-1. Les ponts H sont repris en pointillé. (Code des couleurs : **C02**: orange ; **C_{PR}**: vert ; N : bleu ; O : rouge ; H: blanc ; Cu : sphère fuchsia.)

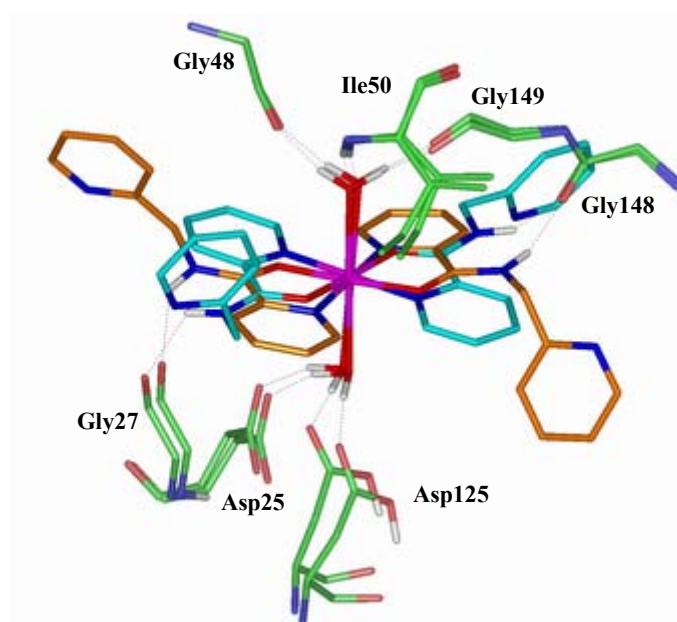


Figure 1.40. Superposition des complexes C02/protéase dans les orientations 2 (bleu) et 4 (orange).

Ces sept ponts hydrogène peuvent également être recensés dans l'orientation 2 dont l'énergie d'interaction est légèrement plus faible. Il est intéressant de noter qu'au terme de la minimisation de ces deux orientations, les molécules d'eau apicales se superposent parfaitement pour former exactement les mêmes ponts H. Les azotes amidiques, quant à eux, sont légèrement décalés mais interagissent avec les mêmes glycines (Figure 1.40.).

Ces études de modélisation moléculaire montrent que C02, pourrait interagir favorablement avec l'enzyme que ce soit dans l'orientation 2 ou dans l'orientation 4. Elles ne permettent donc pas, à ce stade, de pointer les causes de l'inactivité de C02.

Pour conclure cette étude théorique, on peut dire que la structure des complexes C02-C4 leur permet de s'insérer adéquatement dans les différents sous-sites de la protéase. En outre, la possibilité d'inclure au sein même du complexe la molécule d'eau catalytique et la molécule structurale permettant l'interaction avec les flaps a été démontrée. On rentre ainsi typiquement dans les critères du pharmacophore sur lequel se base ce travail.

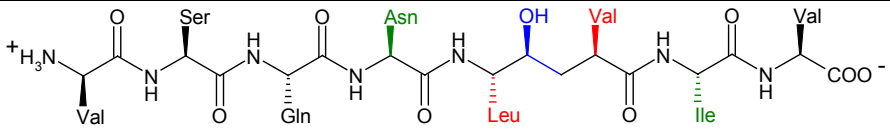
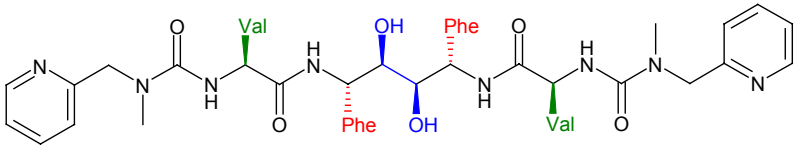
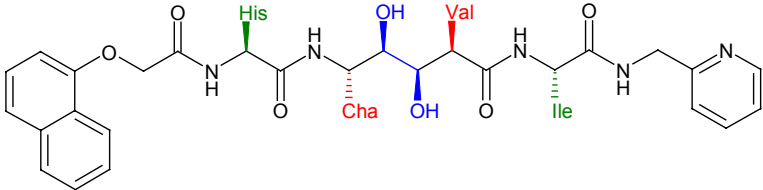
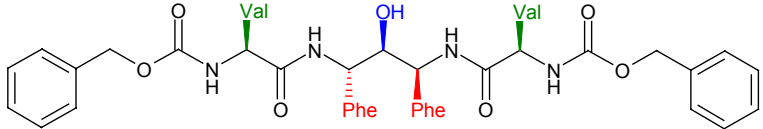
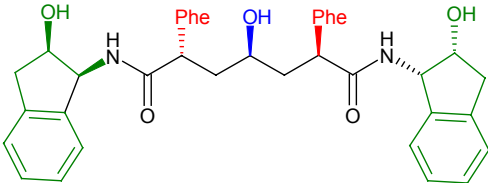
Afin d'affiner l'analyse de ces résultats, nous avons comparé les complexes minimisés au sein du site actif de la protéase à cinq inhibiteurs peptidomimétiques classiques dont la structure cocrystallisée avec l'enzyme est disponible dans la banque de données de Brookhaven, PDB.

... la comparaison avec les inhibiteurs peptidomimétiques

Cinq inhibiteurs peptidiques ou peptido-mimétiques cocrystallisés avec la protéase du VIH-1 ont été superposés aux différents complexes **C02-C4** après leur minimisation dans le site actif de l'enzyme. Il s'agit des inhibiteurs U85548e¹⁴⁰, U77003¹⁷², U75875⁶⁹⁶, A74704⁶⁹⁵, et L700,417⁶⁹⁷ repris dans le tableau 1.28. Ces inhibiteurs possèdent tous une bonne activité anti-protéolytique caractérisée par des constantes d'inhibition ou des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire.

Ces superpositions permettent de visualiser l'occupation par les complexes **C02-C4** des différents sous-sites enzymatiques, ainsi que la position d'éléments d'interaction clés tels que les hydroxyles isostériques ou la molécule d'eau 'structurale'. Elles sont reprises systématiquement pour chaque complexe dans leur(s) orientation(s) la(les) plus favorable(s) aux figures 1.41. à 1.47.

Tableau 1.28. Structure et activité des inhibiteurs peptidomimétiques ayant été superposés aux complexes **C02-C4** minimisés dans le site actif de la protéase. Les groupements hydroxyles isostériques sont colorés en bleu tandis que les résidus P1/P1' et P2/P2' sont représentés respectivement en rouge et en vert. Les valeurs d'activité signalées par un astérisque correspondent à des IC₅₀. (Cha = cyclohexylalanine).

inhibiteur code PDB	K _i /IC ₅₀ * (nM)	Structure des inhibiteurs
U85548e 8HVP	<1	
U77003 1HVI	0.088	
U75875 1HIV	<1.0	
A74704 9HVP	3.0*	
L700,417 4PHV	0.67*	

Dans la première orientation, les triméthoxyphényles de **C1** se superposent bien aux groupements P1/P1' des cinq inhibiteurs peptidomimétiques de référence. Notons que la position en *ortho* de certains méthoxy pourrait générer un encombrement stérique, alors que les méthoxy en *meta* s'orientent favorablement vers les sous-sites S3/S3'. Par contre, les groupements pyridiniques s'écartent assez bien de la superposition : trop peu volumineux pour occuper entièrement les sous-sites S2/S2', ils sont plutôt localisés entre les groupements S1/S1' et S2/S2' des inhibiteurs de référence, dans une zone libre du site actif de l'enzyme (Figure 1.41.a.).

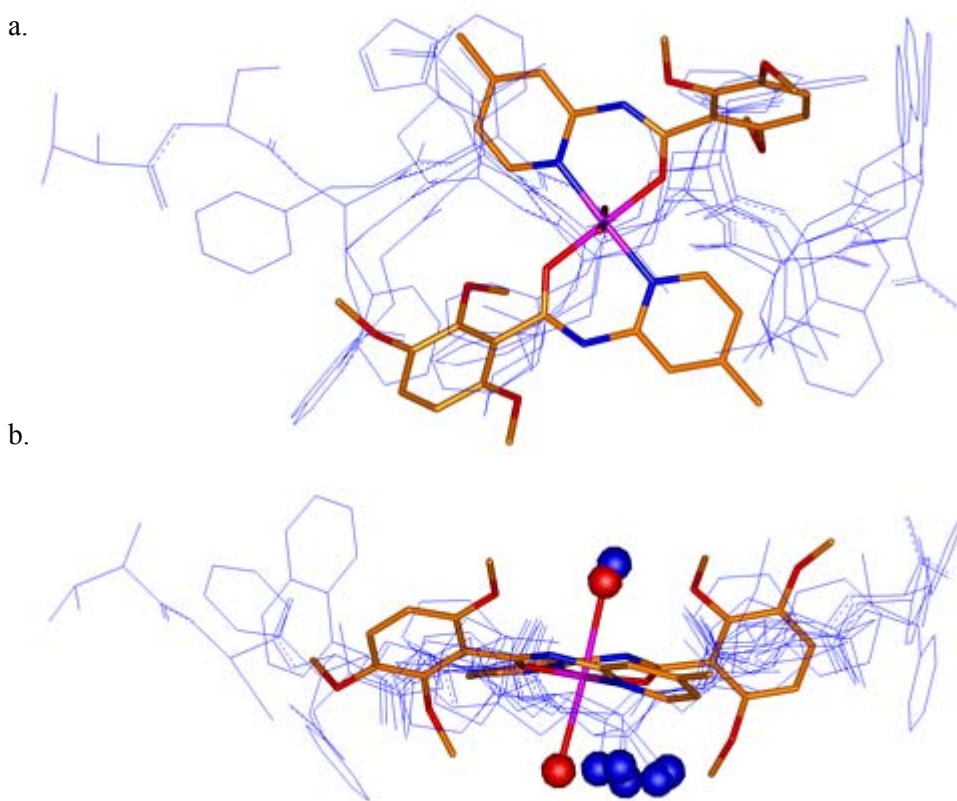


Figure 1.41. Superposition du complexe **C1** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 1 avec cinq inhibiteurs peptidomimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C1** (sphères rouges).

La vue b. de la figure 1.41. permet de se rendre compte de la position des molécules d'eau apicales de **C1** par rapport aux hydroxyles isostériques et à la molécule d'eau structurale observée dans les complexes cristallographiques des inhibiteurs de référence avec la protéase. On peut voir ici qu'une des deux molécules d'eau apicale se superpose bien avec la molécule d'eau structurale. Tout comme cette molécule d'eau structurale, elle forme en effet un pont hydrogène avec l'isoleucine 50

des flaps (Tableau 1.19. et Figure 1.34.). Un léger décalage est observé entre la molécule d'eau apicale catalytique et les hydroxyles isostériques. Ce décalage n'empêche cependant pas la formation des ponts hydrogène cruciaux avec les aspartates catalytiques.

Les énergies d'interaction suggèrent que **C2** adopte préférentiellement la quatrième orientation au sein de l'enzyme. Dans cette orientation, une bonne superposition au niveau des groupements méthoxybenzyles en P2/P2' est observée. Les méthoxy pointent en outre favorablement vers les sous-sites S3/S3'. La superposition au niveau des groupements P1/P1' semble moins adéquate : si une quinoléine occupe assez bien le sous-site S1/S1', la seconde est plutôt localisée entre les poches S1/S1' et S2/S2' (Figure 1.42.a.).

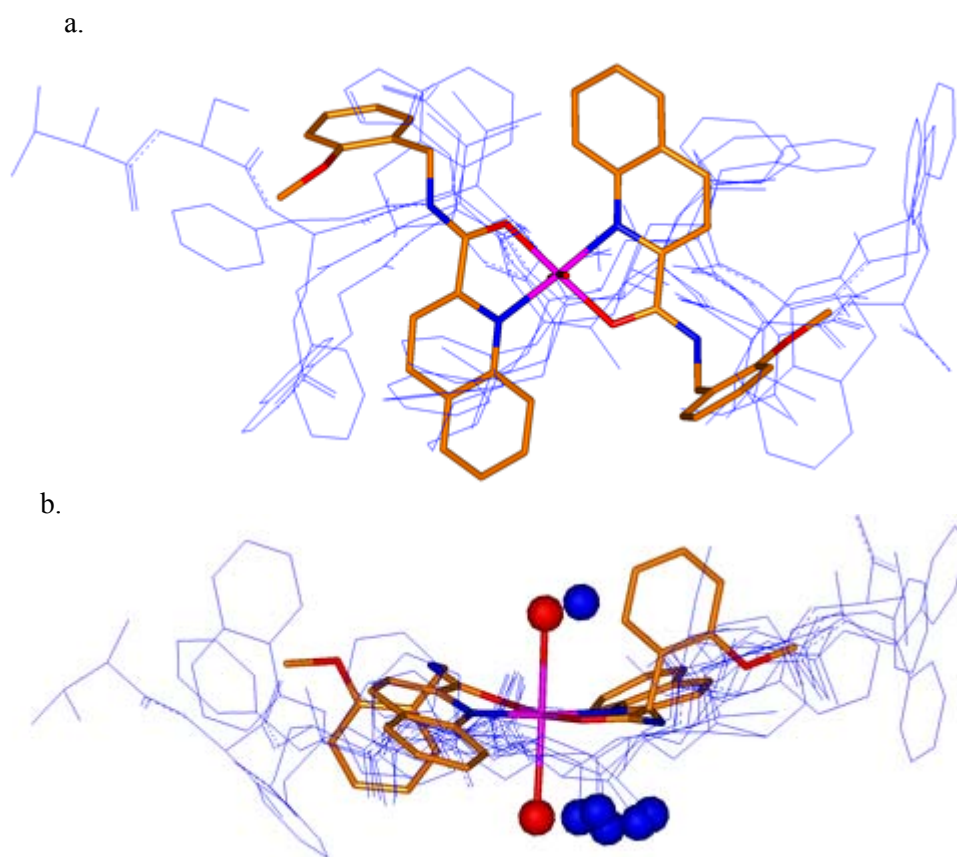


Figure 1.42. Superposition du complexe **C2** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 4, avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C2** (sphères rouges).

L'occupation optimale des différents sous-sites enzymatiques provoque une légère translation de **C2** par rapport à l'axe défini par les molécules d'eau catalytique et structurale. Cette translation s'observe bien dans la vue b. de la figure 1.42. Elle n'empêche cependant pas la formation d'interactions favorables avec les résidus catalytiques et les flaps (Tableau 1.21.).

La deuxième orientation est caractérisée par une énergie d'interaction moins favorable que celle de l'orientation 4. On observe cependant dans cette orientation la formation d'un nombre tout aussi élevé de ponts hydrogène. De plus, la superposition aux inhibiteurs peptidomimétiques de référence est assez bonne tant au niveau des groupements P1/P1' que P2/P2' (Figure 1.43.). Un basculement est cependant observé au niveau des molécules d'eau apicales provoquant d'un côté une bonne superposition aux hydroxyles isostériques et de l'autre un éloignement de la molécule d'eau structurale. Ce dernier déplacement permet d'ailleurs la formation d'un pont hydrogène supplémentaire avec la glycine 48, en plus du pont H habituel avec l'isoleucine 50.

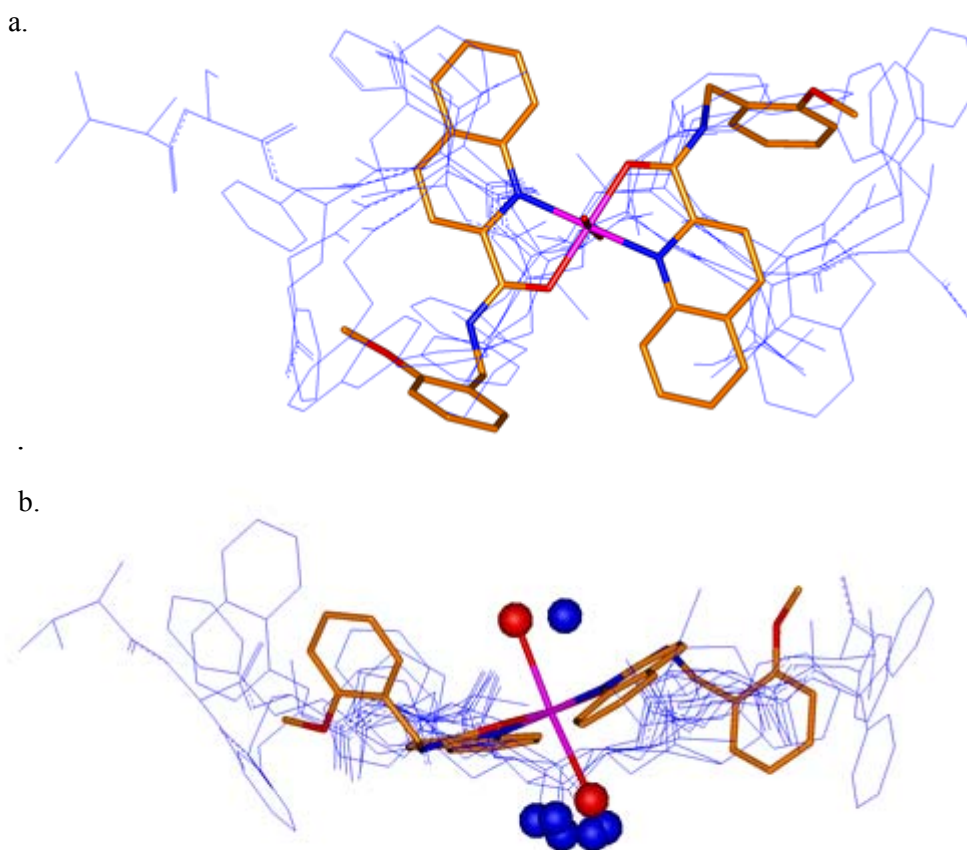


Figure 1.43. Superposition du complexe **C2** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 2 avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C2** (sphères rouges).

Au vu de ces observations, il est donc assez difficile de trancher pour l'une ou l'autre orientation.

On peut faire une analyse très semblable à celle de **C2** pour **C3** dans l'orientation 4, qui est la plus favorable sur le plan de l'énergie d'interaction. La seule différence entre ces deux complexes est bien sûr l'absence de groupement méthoxy sur **C3** pointant vers les sous-sites S3/S3'. La superposition aux inhibiteurs de référence est reprise à la figure 1.44.

Tout comme pour **C2**, l'orientation 2 de **C3** est caractérisée par une énergie d'interaction un peu moins favorable (Tableau 1.22.). Il se forme pourtant dans cette orientation un plus grand nombre de ponts hydrogène (Tableau 1.23.) et la superposition aux inhibiteurs de référence semble adéquate .

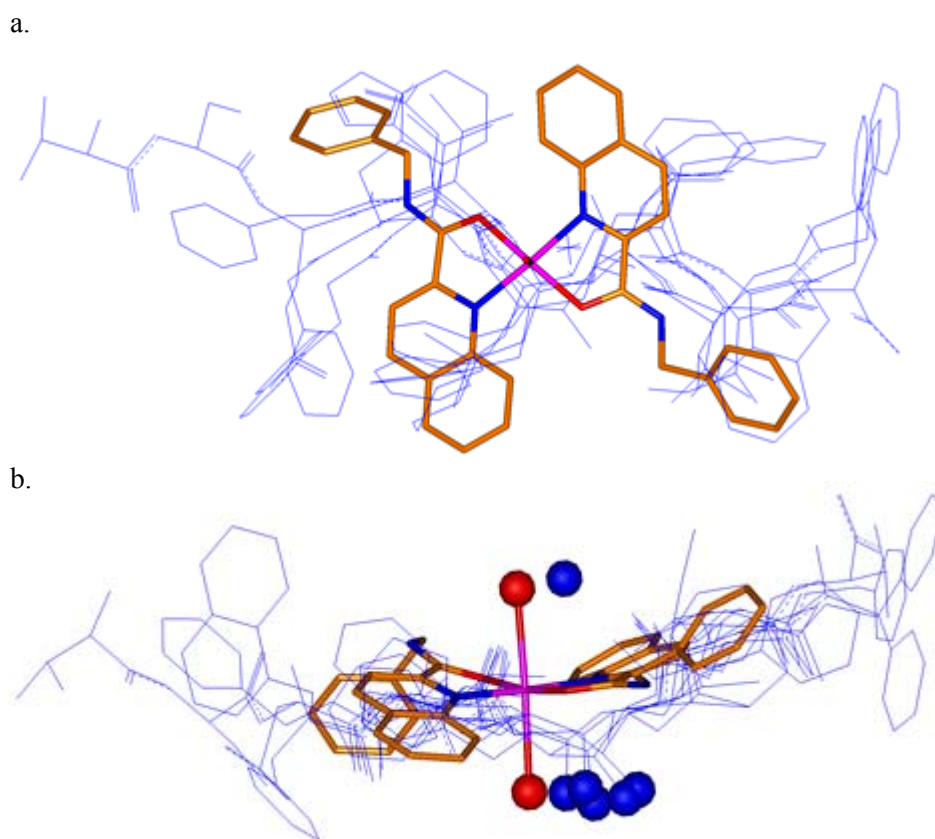


Figure 1.44. Superposition du complexe **C3** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 4 avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C3** (sphères rouges).

Par contre, la première orientation de **C3** dans le site actif de l'enzyme est caractérisée par une énergie d'interaction fort proche de celle de l'orientation 4. Dans cette orientation, la molécule d'eau apicale assurant le relais avec les flaps est parfaitement positionnée, ce qui permet la formation de ponts hydrogène aussi bien avec l'isoleucine 50, qu'avec les glycines 48 et 149. Pour interagir avec ces résidus, la molécule d'eau apicale s'éloigne légèrement de la position de la molécule d'eau structurale. Par contre, la molécule d'eau catalytique se superpose bien aux hydroxyles isostériques (Figure 1.45.b.). Il faut noter cependant que dans cette orientation, une des poches S2/S2' n'est pas occupée par une quinoléine, cette dernière se plaçant plutôt dans l'espace libre entre les sous-sites (Figure 1.45.a.).

L'étude des énergies d'interaction et la comparaison aux inhibiteurs de référence ne nous permettent donc pas de déterminer une orientation préférentielle pour **C3**.

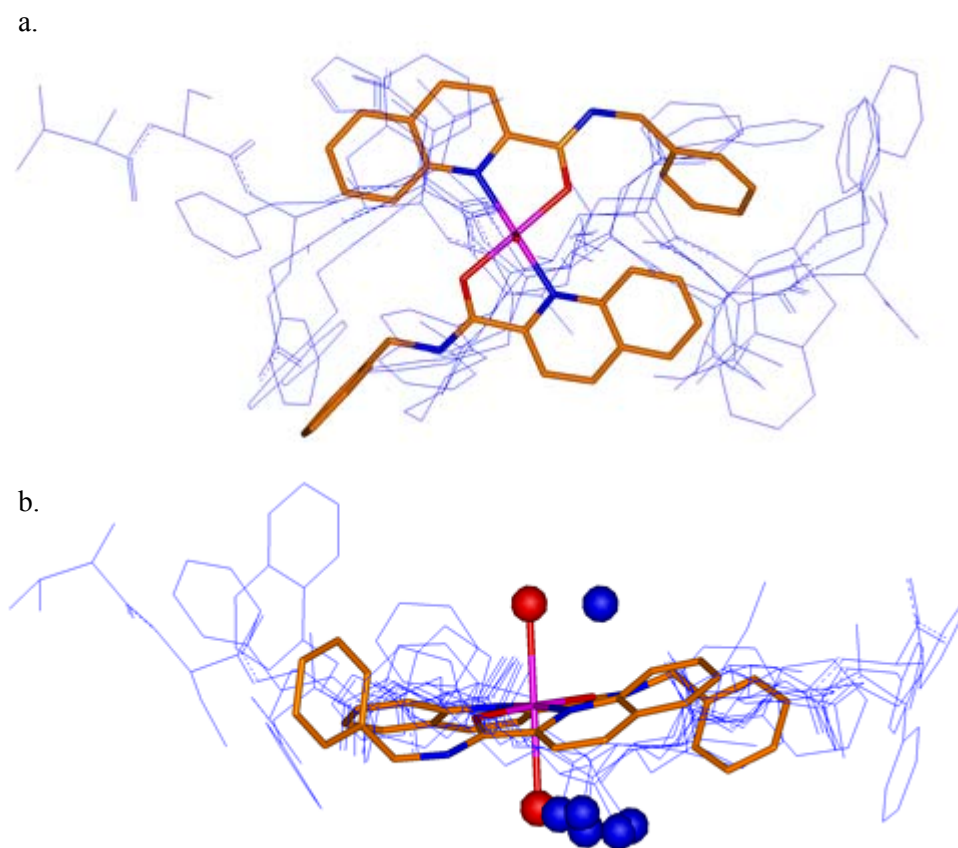


Figure 1.45. Superposition du complexe **C3** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 1 avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C3** (sphères rouges).

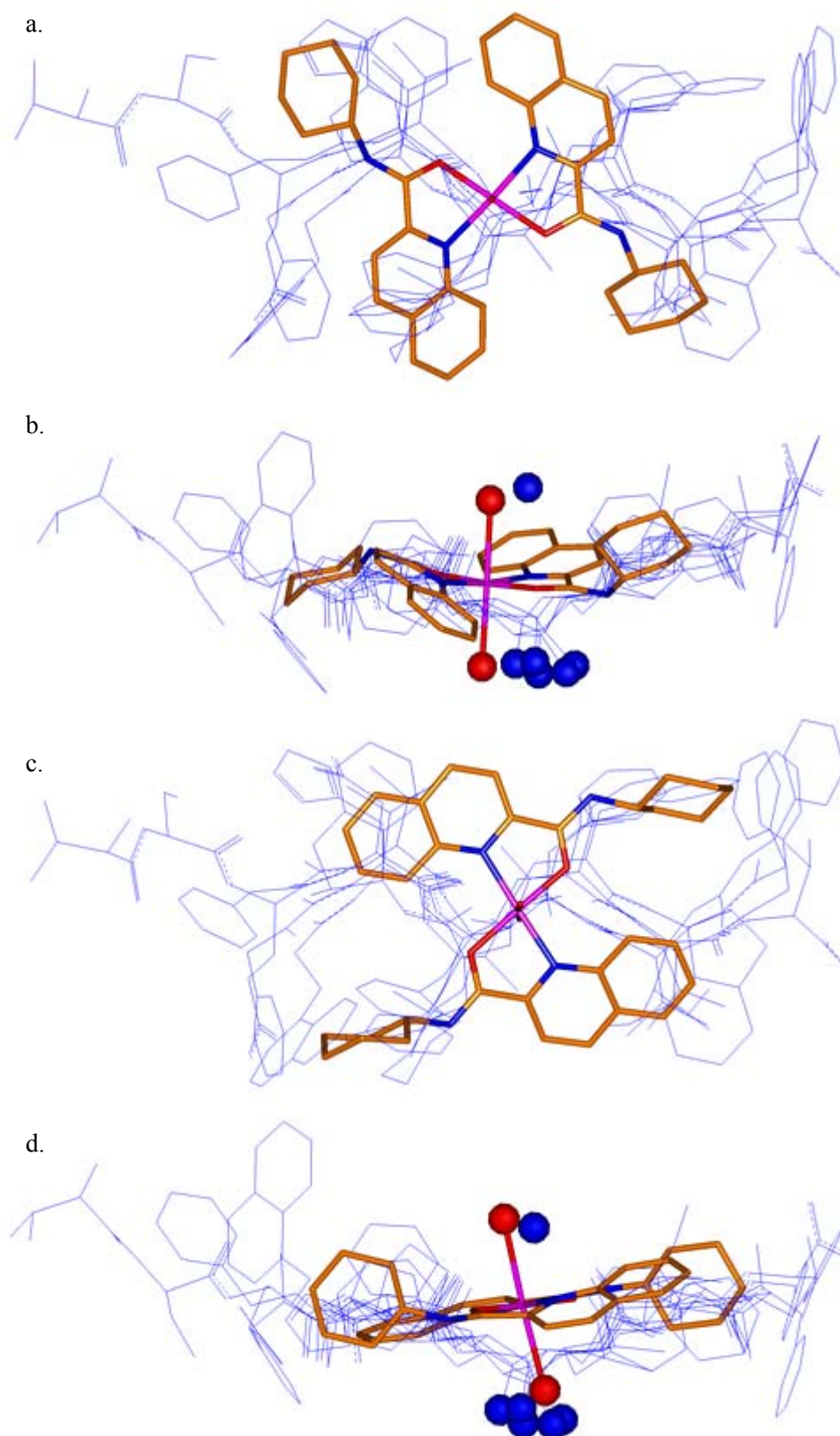


Figure 1.46. Superposition du complexe **C4** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 4 (vues a. et b.) et 1 (vues c. et d.) avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques de référence (en bleu). Les vues a. et c. permettent de localiser les différents sous-sites. Les vues b. et d., à 90°, montrent les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C3** (sphères rouges).

En ce qui concerne **C4**, tout comme **C3** et **C2**, c'est l'orientation 4 qui est favorisée sur le plan de l'énergie d'interaction. Dans l'orientation 4, les superpositions sont semblables à ce qu'on observe pour **C3** et **C2**, à savoir une assez bonne correspondance entre les groupements P2/P2', tandis qu'une quinoléine n'atteint pas une des poches S1/S1' et se positionne plutôt entre les sous-sites, sans pour autant engendrer de gêne stérique (Figure 1.46.a.). Ici aussi, l'axe formé par les molécules d'eau apicales est légèrement décalé par rapport à la molécule d'eau structurale et aux hydroxyles isostériques (Figure 1.46.b.), mais n'empêche pas la formation de ponts hydrogène avec les aspartates catalytiques et les flaps.

La première orientation est également intéressante d'un point de vue énergétique. La superposition aux inhibiteurs de référence permet de constater que les sous-sites S1/S1' et S2/S2' sont bien occupés respectivement par les cyclohexanes et par les quinoléines. Si on compare cette configuration à celle de **C3** dans la même orientation, on remarque que les groupements cyclohexane, plus courts que leurs homologues benzylés remplissent mieux les sous-sites S1/S1' (Figure 1.46.c.). Dans la première orientation, les molécules d'eau apicales sont parfaitement positionnées pour interagir avec les aspartates catalytiques et les flaps. Elles se superposent d'ailleurs bien avec les hydroxyles isostériques et la molécule d'eau structurale (Figure 1.46.d.). Il est, dès lors, de nouveau délicat de trancher en faveur de l'une ou l'autre orientation.

Enfin, **C02** est inactif. La comparaison aux inhibiteurs de référence ne permet cependant pas d'expliquer ce manque d'activité. En effet, dans l'orientation 4, la plus favorable sur le plan énergétique, les groupements P1/P'1 et P2/P'2 se superposent correctement à ceux des inhibiteurs peptidomimétiques. On peut juste noter que le volume des pyridines impliquées dans la complexation semble un peu faible pour occuper entièrement les sous-sites S1/S'1 (Figure 1.47.a.).

Cette occupation adéquate des sous-sites enzymatiques nécessite cependant le basculement de l'axe constitué par les deux molécules d'eau apicales (Figure 1.47.b.). Ce mouvement positionne une de ces molécules d'eau légèrement au-dessus des hydroxyles isostériques, ce qui ne nuit cependant pas à la formation de ponts hydrogène avec les aspartates 25 et 125. La seconde molécule d'eau apicale est décalée par rapport à la molécule d'eau structurale, ce qui lui permet de former des ponts hydrogène supplémentaires avec les glycines 48 et 149.

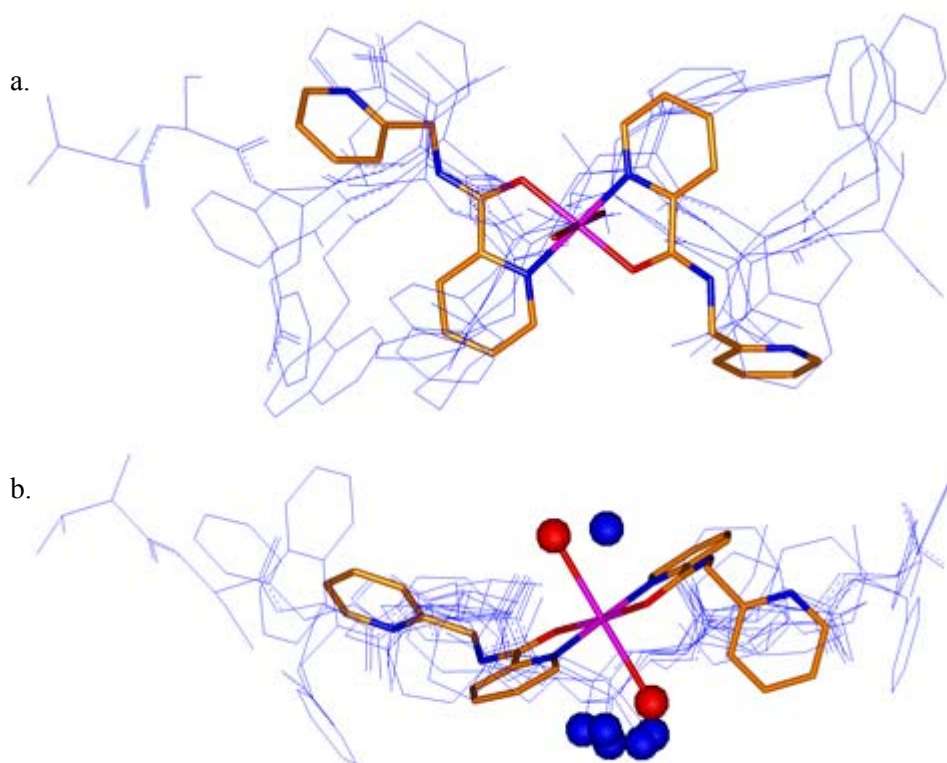


Figure 1.47. Superposition du complexe **C02** (en orange) minimisé dans le site actif de la protéase dans l'orientation 4 avec cinq inhibiteurs peptido-mimétiques (en bleu) cocrystallisés avec l'enzyme. La vue a. permet de localiser les différents sous-sites. La vue b., à 90°, montre les positions relatives des hydroxyles isostériques et de la molécule d'eau structurale (sphères bleues) par rapport aux molécules d'eau apicales de **C02** (sphères rouges).

1.3. Conclusion

Ce premier chapitre était dédié, d'une part, à la détermination de la structure cristallographique des complexes **C0-C4** et, d'autre part, à la modélisation de leur interaction avec la protéase du VIH-1. Au terme de la présentation de ces premiers résultats, une mise au point s'impose.

Des études de diffraction des rayons X ont permis d'élucider la structure cristalline des complexes **C0-C4** issus de l'optimisation du composé chef de file SETCEZ. Contrairement au mode de complexation adopté par SETCEZ, ces complexes impliquent deux ligands organiques bidentates formant un plan autour de l'ion cuivrique central. De part et d'autre de ce plan, les coordinations en position apicale peuvent être assurées par des contre-ions ou des molécules de solvant. En vertu de l'effet Jahn-Teller, une déformation d'élongation est observée au niveau de ces sites de complexation. Il est fort probable qu'en milieu aqueux, ces molécules plus labiles soient échangées par des molécules d'eau. Cette organisation confère aux complexes une structure octaédrique s'adaptant particulièrement bien aux différents sous-sites enzymatiques, tout en conservant les interactions clés avec les aspartates catalytiques et les flaps de l'enzyme, décrites dans le pharmacophore original.

A l'issue de ces études cristallographiques, plusieurs particularités peuvent être pointées :

- Selon la méthode de complexation au cuivre (II) des ligands **L0**, deux types de complexes ont été observés à l'état cristallin : **C02** adopte le mode de complexation décrit ci-dessus, caractérisant la plupart des complexes qui font l'objet de cette étude. Par contre, **C01** comprend un ligand tridentate organisé autour de l'ion cuivrique similairement à SETCEZ et un deuxième ligand bidentate asymétrique. On peut dès lors se demander quel sera le type de complexation rencontré en solution, notamment dans les conditions des tests enzymatiques.
- La structure de **C3** n'a pu être déterminée par DRX. En effet, les essais de cristallographie ont débouché sur l'obtention du ligand organique **L3** seul, et non sur le complexe qu'il forme avec le cuivre (II). Le complexe **C3** possède cependant une activité antiprotéolytique en solution. Nous avons dès lors postulé que **L3**, possédant une structure très proche de celle de **L2**, se complexe de la même manière que celui-ci à l'ion cuivrique, permettant ainsi une activité

inhibitrice. Il sera cependant nécessaire de s'assurer de ce mode de complexation en milieu biologique.

- Enfin, **C4** présente une instabilité dans les conditions des tests enzymatiques. Sa structure est cependant similaire à celle de **C2**. Cette différence de comportement reste à expliquer.

Sur base de la structure de ces complexes à l'état cristallin, une étude de modélisation moléculaire a été entreprise, afin de poser de premières hypothèses quant aux relations unissant la structure et l'activité de ces composés. En effet, la géométrie octaédrique typique des complexes au cuivre (II)⁶⁹⁴ permet d'organiser d'une manière adéquate les différents ligands au sein du site actif de la protéase. Ainsi, les deux ligands organiques principaux formant un plan autour du centre métallique peuvent s'insérer dans les sous-sites S1/S1' et S2/S2' de l'enzyme. De part et d'autre de ce plan, les molécules d'eau apicales interagissent avec les aspartates catalytiques et certains résidus des flaps. On incorpore ainsi directement dans la structure de l'inhibiteur la molécule d'eau catalytique et la molécule d'eau structurale observée dans la plupart des inhibiteurs peptidomimétiques cocrystallisés avec la protéase (Figure 1.32.). Notons ici que seul un métal comme le cuivre(II) peut assurer cette distribution des éléments d'interaction dans l'espace du site actif de l'enzyme.

Les études de modélisation moléculaire ont confirmé que la géométrie des complexes **C02-C4** leur permet de s'insérer dans le site actif et d'interagir non seulement avec les différents sous-sites mais aussi avec le site catalytique et les flaps. On peut ainsi expliquer l'important gain d'activité inhibitrice de **C1**, **C2** et **C3** par rapport au complexe chef de file SETCEZ. Cependant quelques points restent à élucider. Ainsi, la structure à l'état cristallin de **C02** et de **C4** leur permettrait également de s'insérer dans le site actif de l'enzyme et donc d'avoir une activité inhibitrice. S'il est difficile de parler de **C4** dont le potentiel d'inhibition n'a pu être évalué, le cas de **C02** est plus énigmatique encore. En effet, la géométrie qu'adopte **C02** en milieu cristallin semble tout à fait correspondre aux critères d'activité que nous venons de mentionner. Il faut donc trouver une autre explication au manque d'activité inhibitrice de **C02**.

En outre, si la structure des complexes **C0-C4** à l'état cristallin permet bien de proposer un début d'explication aux activités inhibitrices observées, une étude en solution est incontournable. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre consacré aux objectifs de cette thèse, l'utilisation de complexes métallo-organiques dans une stratégie de conception de médicaments requiert une caractérisation des propriétés spécifiques des espèces métalliques, et plus particulièrement la détermination du comportement de ces complexes en solution. Nous espérons ainsi pouvoir lever le voile sur les interrogations qui subsistent au terme de ce premier chapitre.

2. Caractérisation structurale de complexes au cuivre(II) en solution. Influence de la stabilité des complexes sur leur activité inhibitrice

La détermination structurale des complexes **C0-4** à l'état cristallin a permis de proposer de premières pistes de réflexion quant aux relations unissant la structure de ces composés et leur activité anti-enzymatique. Cependant, à l'issue de ce premier chapitre, de nombreuses questions restent en suspens. Elles concernent principalement le mode de complexation caractérisant les inhibiteurs lors de leur interaction avec la protéase. Ainsi, il est indispensable de s'assurer que l'activité inhibitrice de **C1** et **C2** peut être attribuée aux complexes observés en cristallographie. Il faut également montrer que **C3** adopte une géométrie semblable à celle de **C2** dans les conditions des tests enzymatiques. Enfin, la complexation de **L0** par différents sels d'ions cuivriques débouche sur deux types de complexe en milieu cristallin. La détermination de (ou des) géométrie(s) adoptée(s) en solution devrait permettre d'expliquer le manque d'activité inhibitrice de **C0**.

Ce deuxième chapitre, dédié à la caractérisation des complexes **C0-4** en solution, fait appel à deux techniques expérimentales : la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS) et la résonance paramagnétique électronique (RPE)*. Nous étudierons, dans un premier temps, par spectrométrie de masse, la répartition des espèces présentes lors de la dissolution de SETCEZ et des complexes **C0-4**. A l'aide de la RPE, nous tenterons d'évaluer le type de complexe formé majoritairement dans les tampons utilisés lors des tests enzymatiques. A la lumière de nouvelles données biologiques, nous verrons que seuls les complexes suffisamment stables sont susceptibles de présenter une activité inhibitrice.

* Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire du Professeur J. Remacle aux FUNDP (ESI-MS) et au Centre de l'Oxygène R&D dirigé par le Professeur G. Deby-Dupont à l'ULg (RPE)

2.1. La détermination par spectrométrie de masse des espèces présentes en solution

... la caractérisation structurale de SETCEZ et des complexes **C0**⁶⁷⁸

La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray est une technique de choix pour étudier les complexes métallo-organiques en solution. En effet, cette méthode d'ionisation très douce permet de visualiser l'ion moléculaire intact en conservant les liaisons non covalentes entre le métal et ses ligands^{617,621,622}. On peut ainsi caractériser les différentes espèces présentes dans une solution donnée.

En l'occurrence, les tests enzymatiques ont été réalisés dans un tampon acétate de sodium 10^{-1} M à pH 5.5⁴⁸³, pH pour lequel la protéase du VIH-1 présente une activité optimale. Nous avons dès lors travaillé dans des conditions de pH similaires (tampon acétonitrile 10^{-2} M), après avoir dissout les échantillons des différents complexes dans du méthanol ou de l'eau. La solution initiale a ensuite été diluée 10 fois dans le tampon pour atteindre une concentration finale d'environ 0.2 mg/ml.

Dans ces conditions, nous avons obtenu pour SETCEZ le spectre repris à la figure 2.1. Avant d'analyser ces résultats, il est bon de rappeler que le cuivre possède deux isotopes principaux : il est en effet constitué de 69.09 % de ⁶³Cu et de 30.91% de ⁶⁵Cu. Les pics attribués aux complexes au cuivre seront dès lors théoriquement dédoublés dans ces proportions. Lorsque le complexe présente une charge +1, l'écart entre ces pics est de deux unités. La composition isotopique du cuivre peut ainsi faciliter l'identification des différents pics repris sur le spectre.

Le tableau 2.1. reprend la valeur des pics observés sur le spectre, leur abondance relative, l'espèce correspondante ainsi que la valeur théorique du rapport masse sur charge de cette espèce. Dans le cas de SETCEZ, trois pics principaux peuvent être relevés. L'espèce majoritaire ($m/z = 288.88$) est attribuée au complexe tridentate formé par le ligand de SETCEZ déprotoné et l'ion cuivrique. A l'exception des deux molécules d'eau plus labiles, on retrouve ainsi la géométrie observée à l'état cristallin⁴⁸⁹. Un pic moins important est décalé de 41 unités, ce qui correspond à un ligand additionnel : une molécule de CH₃CN issue du tampon. Enfin un troisième pic peut être attribué au complexe de charge +1 constitué par un ligand tridentate déprotoné, un ligand bidentate neutre et l'ion cuivrique. On peut comparer cette géométrie à celle adoptée à l'état cristallin par le complexe **C01**. Le pic correspondant au ligand seul protoné se distingue à peine du bruit de fond.

SETCEZ

C02

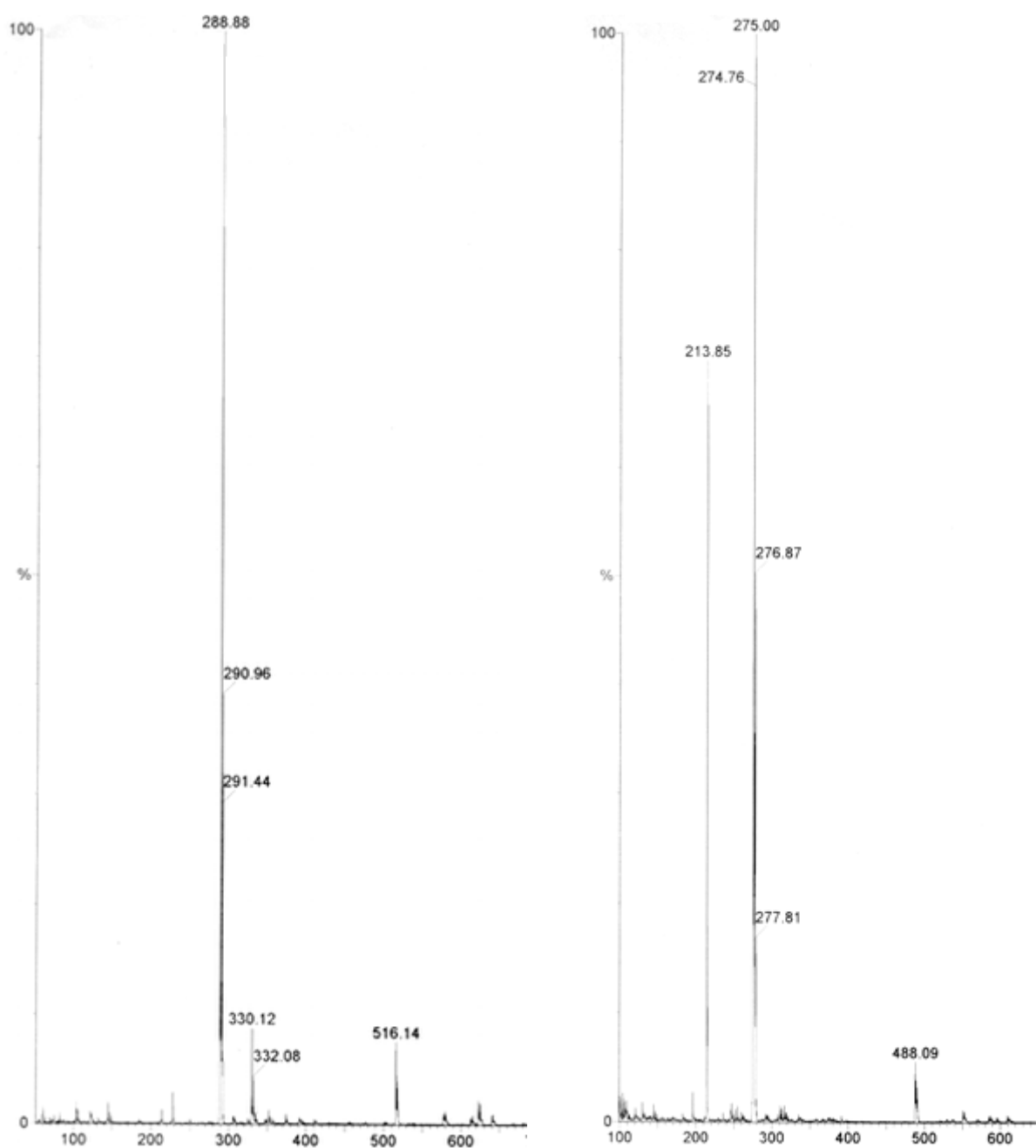


Figure 2.1. Spectres de masse des complexes SETCEZ et C02.

On peut donc dire que dans une solution de pH 5.5, SETCEZ persiste principalement sous la forme observée par DRX, même si les molécules d'eau cristallographiques peuvent être échangées par d'autres petits ligands.

Afin de déterminer si une décomplexation pouvait se produire au cours du temps, le spectre de SETCEZ a été repris toutes les demi-heures pendant quatre heures. Aucun changement notable n'a été décelé.

Tableau 2.1. Espèces observées en solution pour SETCEZ par spectrométrie de masse. La valeur des pics correspond au rapport masse sur charge de l'espèce observée. Les abondances relatives sont exprimées en %.

SETCEZ: masse du ligand: 227 Da				
m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
227.92	3	$L + H^+$	+1	228
288.88	100	$L - H^+ + Cu^{2+}$	+1	289
290.96				291
330.12	10	$L - H^+ + Cu^{2+} + CH_3CN$	+1	330
332.08				332
516.14	8	$2L - H^+ + Cu^{2+}$	+1	516

Les spectres des complexes **C01** et **C02** ont été pris en suivant les mêmes conditions expérimentales. Le relevé des pics et leur attribution se trouve au tableau 2.2. On retrouve exactement les mêmes espèces en solution pour **C01** et **C02**, même si leurs abondances relatives varient quelque peu. Ainsi pour **C01**^{*}, l'espèce majoritaire est le ligand **L0** protoné. Vient ensuite le complexe cristallographique formé par un ligand tridentate dont l'amide est déprotonée, un ligand bidentate neutre et l'ion cuivrique. L'espèce correspondant au complexe formé à partir d'un seul ligand tridentate déprotoné est minoritaire.

Tableau 2.2. Espèces observées en solution pour les complexes **C0** par spectrométrie de masse. Les abondances relatives sont exprimées en %. On retrouve les mêmes espèces en proportions différentes pour **C01** et **C02**.

C0: masse du ligand: 213 Da						
C01		C02		C01-C02		
m/z obs.	%	m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
213.94	100	213.85	70	$L + H^+$	+1	214
274.88	28	275.00	100	$L - H^+ + Cu^{2+}$	+1	275
277.02		276.87				277
488.18	40	488.09	6	$2L - H^+ + Cu^{2+}$	+1	488
490.20						490

* Pour éviter toute redondance avec le spectre de **C02**, le spectre de **C01** est repris en annexe.

Le complexe **C02** présente les mêmes espèces en solution, mais ici c'est le complexe formé par un seul ligand tridentate qui est majoritaire. Le ligand libre est par contre en plus faible proportion. Le complexe constitué d'un ligand tridentate, d'un ligand bidentate et de l'ion cuivrique est quant à lui minoritaire (Figure 2.1.).

En outre, l'analyse de ces spectres met en évidence l'absence de pic correspondant au complexe de charge +2 formé par deux ligands bidentates s'organisant de part et d'autre de l'ion cuivrique et caractérisé par des rapports masse sur charge théoriques de 244.5 et 245.5*. Ce pic refléterait la structure cristallographique de C02 qui n'existe donc pas en solution à pH 5.5.

Ce résultat est primordial pour expliquer le manque d'activité inhibitrice des complexes **C0**. En effet, nous avons montré dans le chapitre précédent que seul le complexe constitué de deux ligands bidentates était susceptible d'interagir adéquatement avec la protéase. Malheureusement, en solution, on retrouve soit le complexe adoptant une géométrie similaire à celle de SETCEZ, mais dont l'activité est diminuée par la perte d'un carbonyle susceptible d'interagir avec les flaps, soit le complexe observé par **C01** à l'état cristallin. Dans ce cas, le deuxième ligand bidentate génère une gêne stérique qui empêche toute insertion du complexe dans le site actif de l'enzyme. Il est donc normal de n'observer aucune activité inhibitrice de la part de **C01** et **C02**⁶⁷⁸.

A ce stade de notre analyse, on peut se demander, d'une part, pourquoi le complexe **C02** existe à l'état cristallin, alors qu'il n'est pas observé en solution et, d'autre part, pourquoi le mode de complexation de **C01** est favorisé en solution. Pour aborder ces questions, il est nécessaire de se rendre compte qu'un complexe métallo-organique peut exister sous plusieurs formes en solution, suivant les conditions, notamment de pH ou de solvant, dans lesquelles il se trouve. Le processus de cristallisation modifie cet équilibre en faveur de l'une ou l'autre forme. En l'occurrence, dans le cas de **C02**, c'est une espèce existant sous forme de trace en solution, mais peut être moins soluble, qui a été favorisée à l'état cristallin. Il est en effet établi que c'est généralement le complexe le moins soluble que l'on retrouvera au sein du cristal⁶⁹⁸.

* On retrouve bien sur le spectre de **C02** un pic aux alentours de 244, mais son intensité est très faible et se perd dans le bruit de fond.

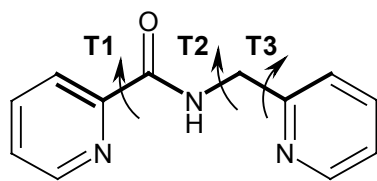


Figure 2.2. Angles de torsion (en gras) étudiés lors de l'analyse conformationnelle du ligand **L0**.

Afin d'évaluer l'énergie nécessaire au ligand **L0** pour changer de conformation lors de la complexation au cuivre (II), nous avons effectué un balayage conformationnel en mécanique moléculaire sur l'angle de torsion T1 puis simultanément sur les angles T2 et T3 à l'aide du champ de force CFF95⁶²⁹ (Figure 2.2.). Après leur optimisation en mécanique quantique (méthode HF/6-31g*), la conformation de plus faible énergie correspondant à celle qu'adopte le ligand non

complexé, a été comparée aux conformations correspondant au ligand préorganisé pour un mode de complexation tridentate (T1=T2=T3=180°) ou bidentate (T1=0°).

Tableau 2.3. Valeurs adoptées par les angles T1, T2 et T3 en fonction des différentes conformations du ligand **L0**.

conformation	T1 [°]	T2 [°]	T3 [°]	ΔE [kcal/mol]
minimum	180	-90	80	0
tridentate	180	180	180	3.1
bidentate	0	-90	80	11.5

Il ressort de ces calculs qu'il suffit au ligand de franchir une barrière énergétique de 3.1 kcal/mole pour adopter la conformation préorganisée pour un mode de complexation tridentate. Il lui faudra par contre 11.5 kcal/mole pour adopter le mode de complexation bidentate (Tableau 2.3.). En effet, T1 est stabilisé à 180° par un pont hydrogène intramoléculaire formé entre l'azote amidique protoné NH(10) et l'azote N(2) de la pyridine adjacente. La préorganisation du ligand joue donc en faveur d'un mode de complexation tridentate, comme celui rencontré au sein de **C01**. Ce mode de complexation est cependant défavorable à l'inhibition de la protéase.

*... l'étude comparative des complexes **C1-C4***

L'étude par spectrométrie de masse des complexes **C1-C4** a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour les complexes SETCEZ et **C0**. Les spectres obtenus, repris aux figures 2.4. et 2.5., sont caractérisés par un grand nombre de pics, traduisant une grande variété d'espèces en solution.

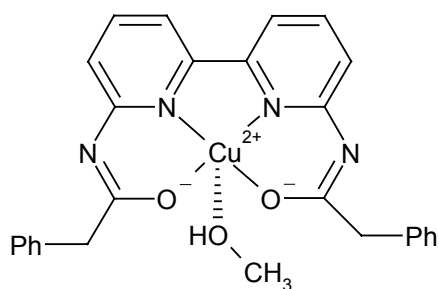


Figure 2.3. Structure cristallographique du complexe au cuivre (II) SUNZIK⁷⁰².

Ainsi dans le cas de **C1**, l'espèce majoritaire correspond au complexe cristallographique (Tableau 2.4.). La présence de cette espèce en solution peut être visualisée par trois pics. Le premier, dont le rapport m/z vaut 333.73, correspond au complexe formé par deux ligands **L1** neutres et l'ion cuivrique et porte donc une charge +2. Le deuxième, dont le rapport m/z vaut 666.35, correspondrait au même complexe, mais dans ce cas, un des deux ligands serait déprotoné au niveau de l'azote amidique. *A priori*, une fonction amidique n'est pas acide ($pK_a \sim 15$) et

il est donc improbable d'observer une telle déprotonation lorsque le ligand est libre. Lors de la complexation avec un métal de transition, cette déprotonation est couramment observée lorsque la chélation se produit via l'azote de la fonction amide. Elle est cependant plus rare lorsque la chélation se produit par l'oxygène amidique comme dans le cas de **C1**. Des précédents existent néanmoins^{680,699} et quelques structures de tels complexes peuvent être recensées dans CSD^{700,701}. A titre d'exemple, nous avons repris la structure du complexe au cuivre (II) SUNZIK⁷⁰² à la figure 2.3. Remarquons également que le complexe symétrique possédant deux ligands déprotonés n'est pas observable par ESI-MS puisque sa charge est nulle.

Tableau 2.4. Espèces observées en solution pour **C1** par spectrométrie de masse. Les abondances relatives sont exprimées en %. Les espèces en italique restent hypothétiques.

C1 : masse du ligand: 302 Da				
m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
303.16	80	$L + H^+$	+1	303
333.73	100	$2L + Cu^{2+}$	+2	333.5
334.34				334.5
365.09	5	$L + Cu^+$	+1	365
464.00	10	$L + Cu^{2+} + ClO_4^-$	+1	464.5
466.09				466.5
666.35	15	$2L + Cu^{2+} - H^+$	+1	666
668.38				668
766.18	52	$2L + Cu^{2+} + ClO_4^-$	+1	766.5
768.14				768.5

Enfin, un troisième pic est caractérisé par un rapport m/z de 464.00 et correspond au même complexe formé de deux ligands neutres et de l'ion cuivrique complété par un perchlorate en position apicale. Notons de nouveau que le complexe possédant deux perchlorates en positions apicales est neutre et ne peut donc être observé en spectrométrie de masse.

Le ligand **L1** protoné est également présent en proportion importante ($m/z = 303.16$). Enfin, les deux pics restants sont plus délicats à assigner : le premier, dont le rapport m/z vaut 271, aurait une masse inférieure à celle du ligand libre, si on considère une charge unitaire. Son origine reste indéterminée. Le deuxième, en $m/z = 365.09$, est en très faible proportion et pourrait correspondre à un seul ligand complexé au cuivre. Dans ce cas, sa charge +1 plaide en faveur d'une réduction de l'ion cuivrique en ion cuivreux. De nouveau, une prise de spectre a été réalisée toutes les demi-heures pendant 4 heures. Contrairement à SETCEZ ou aux complexes **C0**, on observe une évolution au cours du temps, avec un phénomène de décomplexation progressif. Cependant, au bout de 4 heures, l'abondance cumulée des pics correspondant aux complexes est toujours supérieure à celle du ligand libre.

L'analyse du spectre de masse de **C2** est plus délicate encore. Le tableau 2.5 nous montre que contrairement à **C1**, c'est ici le ligand libre protoné qui prédomine. Suit ensuite un pic en $m/z = 469$ que nous avons attribué à un complexe qui serait formé de trois ligands neutres et de l'ion cuivrique et qui porterait donc une charge +2. On pourrait imaginer, dans ce cas, que deux ligands complexent le cuivre de manière bidentate, et qu'un troisième ligand monodentate se trouve en position apicale. Parallèlement, on pourrait attribuer au pic 616.00 le complexe formé de quatre ligands neutres et de l'ion cuivrique. Il y aurait ici un deuxième ligand monodentate en position apicale.

Le complexe observé en cristallographie peut être reflété par les pics de rapport masse sur charge 323.85, 646.30 et 746.25. La même analyse que celle du spectre **C1** peut être faite ici : le premier pic correspond en effet au complexe de charge +2 formé par deux ligands neutres et l'ion cuivrique ; le deuxième à ce même complexe mais avec un des deux ligands déprotoné et le troisième au même complexe mais avec un ion perchlorate en position apicale.

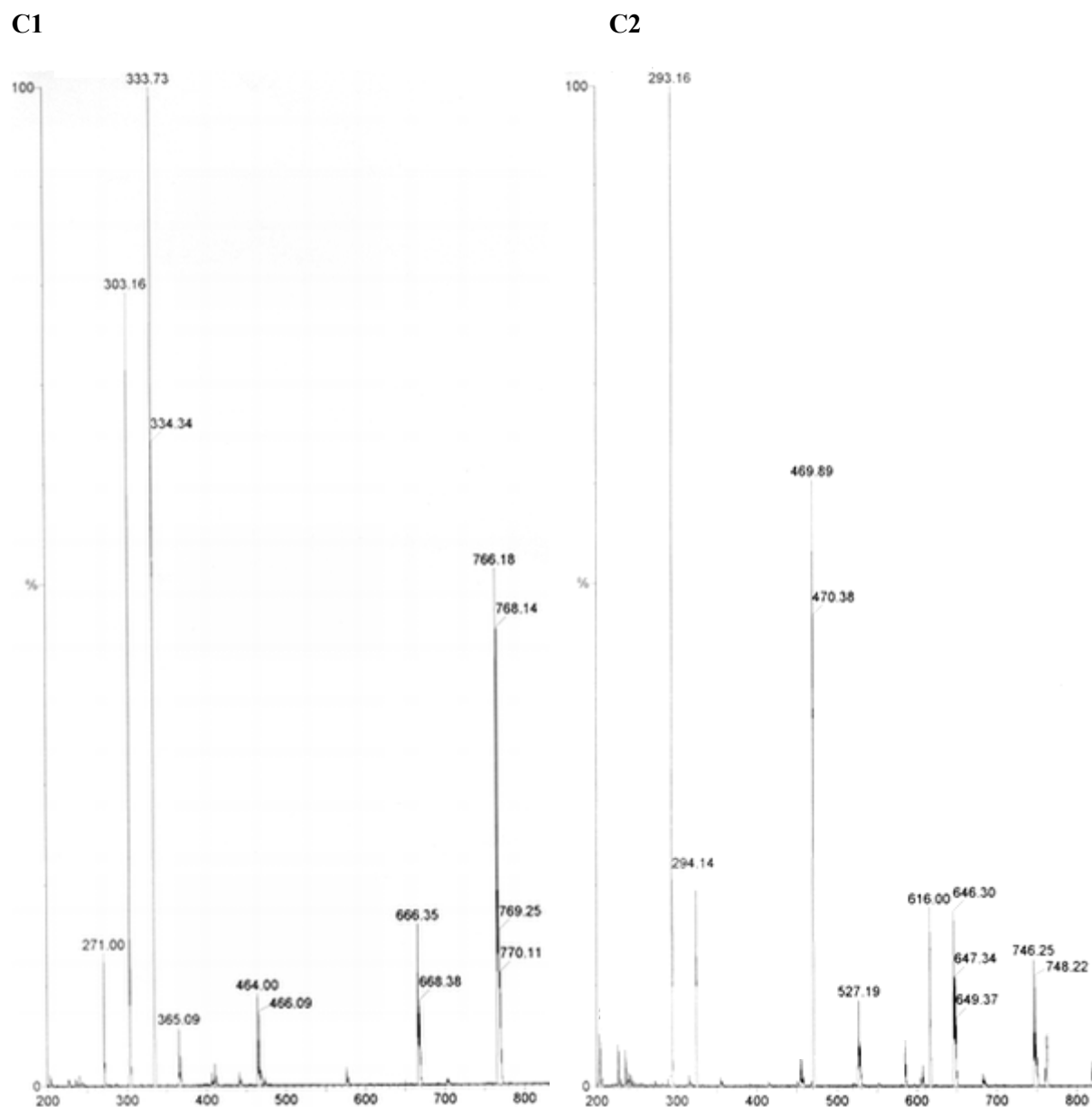


Figure 2.4. Spectres de masse des complexes **C1** et **C2**.

Enfin, deux pics moins intenses sont plus difficiles à assigner, respectivement en m/z valant 527.19 et 647.34. On pourrait par exemple attribuer le premier à un complexe formé de l'ion cuivrique, d'un ligand monodentate, d'un perchlorate et de quatre molécules d'eau. Le second pourrait résulter de la réduction du complexe cristallographique.

Tableau 2.5. Espèces observées en solution pour **C2** par spectrométrie de masse. Les abondances relatives sont exprimées en %. Les espèces en italique restent hypothétiques.

C2: masse du ligand: 292 Da				
m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
293.16	100	$L + H^+$	+1	293
323.85	20	$2L + Cu^{2+}$	+2	323.5
469.89	61	$3L + Cu^{2+}$	+2	469.5
470.38				470.5
527.19	9	$L + Cu^{2+} + ClO_4^- + 4H_2O$	+1	526
616.00	18	$4L + Cu^{2+}$	+2	615.5
646.30	17	$2L + Cu^{2+} - H^+$	+1	646
647.34	13	$2L + Cu^+$	+1	647
649.37				649
746.25	23	$2L + Cu^{2+} + ClO_4^-$	+1	746
748.22				748

Bien qu'elle soit moins marquée que dans le cas de **C1**, on observe ici aussi une légère décomplexation de **C2** au cours du temps. Si on compare entre eux les comportements de **C1** et **C2** en solution, il semble que la proportion de complexe subsistant lors de la dissolution de l'échantillon soit plus importante pour **C1**.

Le spectre de masse de **C3** est caractérisé par une proportion très importante de ligand libre protoné (Figure 2.5.). Il n'est dès lors pas vraiment étonnant de n'avoir pas obtenu le complexe en cristallographie, puisqu'il est déjà minoritaire en solution. A part cette différence notable, on observe les mêmes espèces en solution que celles recensées pour **C1** (Tableau 2.6.). En effet, trois pics correspondent au complexe formé de deux ligands **L3** et de l'ion cuivrique : en 293.76, il s'agit du complexe de charge +2 comprenant deux ligands neutres ; lorsqu'un ligand est déprotoné, on observe un pic de charge +1 en 586.16 ; et quand un ion perchlorate vient s'ajouter en position apicale, un troisième pic apparaît ayant un rapport m/z de 686.14. Enfin, le pic observé en 424.87 pourrait correspondre soit au complexe formé d'un ligand neutre, de l'ion cuivrique et d'un perchlorate, soit au complexe formé de trois ligands et de l'ion cuivrique. Le spectre de **C3** n'évolue pas au cours du temps.

Tableau 2.6. Espèces observées en solution pour **C3** par spectrométrie de masse. Les abondances relatives sont exprimées en %. Les espèces en italique restent hypothétiques.

C3: masse du ligand: 262 Da				
m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
263.10	100	$L + H^+$	+1	263
293.76	12	$2L + Cu^{2+}$	+2	293.5
424.87	10	$L + Cu^{2+} + ClO_4^-$ ou $3L + Cu^{2+}$	+1 +2	424.5 424.5
586.16 588.09	15	$2L + Cu^{2+} - H^+$	+1	586 588
686.14	10	$2L + Cu^{2+} + ClO_4^-$	+1	686.5

Pour terminer, le spectre de masse de **C4** montre que la forme complexée au cuivre (II) est majoritaire (Figure 2.5.). On peut de nouveau en faire une analyse similaire à celle du spectre de **C1** ou de **C2** (Tableau 2.7.) . Le complexe formé de deux ligands **L4** et de l'ion cuivrique, comme celui que nous avons obtenu en cristallographie, peut être visualisé au niveau des pics 285.73 (les deux ligands sont neutres), 270.28 (un des deux ligands est déprotoné), et 670.21 (un ion perchlorate additionnel se trouve en position apicale). Un pic important, de rapport m/z valant 412.91, pourrait correspondre au complexe de charge +2 formé à partir de trois ligands **L4**. Enfin, le pic en 571.16 pourrait peut-être être attribué au complexe cristallographique réduit. On n'observe pas de décomplexation au cours du temps. **C4** semble dès lors aussi bien se maintenir sous forme de complexe en solution que **C1**.

Tableau 2.7. Espèces observées en solution pour **C4** par spectrométrie de masse. Les abondances relatives sont exprimées en %. Les espèces en italique restent hypothétiques.

C4: masse du ligand: 254 Da				
m/z obs.	%	espèce	charge	m/z th.
255.07	83	$L + H^+$	+1	255
285.73 286.37	100	$2L + Cu^{2+}$	+2	285.5 286.5
412.91 413.38	64	$3L + Cu^{2+}$	+2	412.5 413.5
570.28 572.27	14	$2L + Cu^{2+} - H^+$	+1	570 572
571.16	23	$2L + Cu^+$	+1	571
670.21 672.32	27	$2L + Cu^{2+} + ClO_4^-$	+1	670.5 672.5

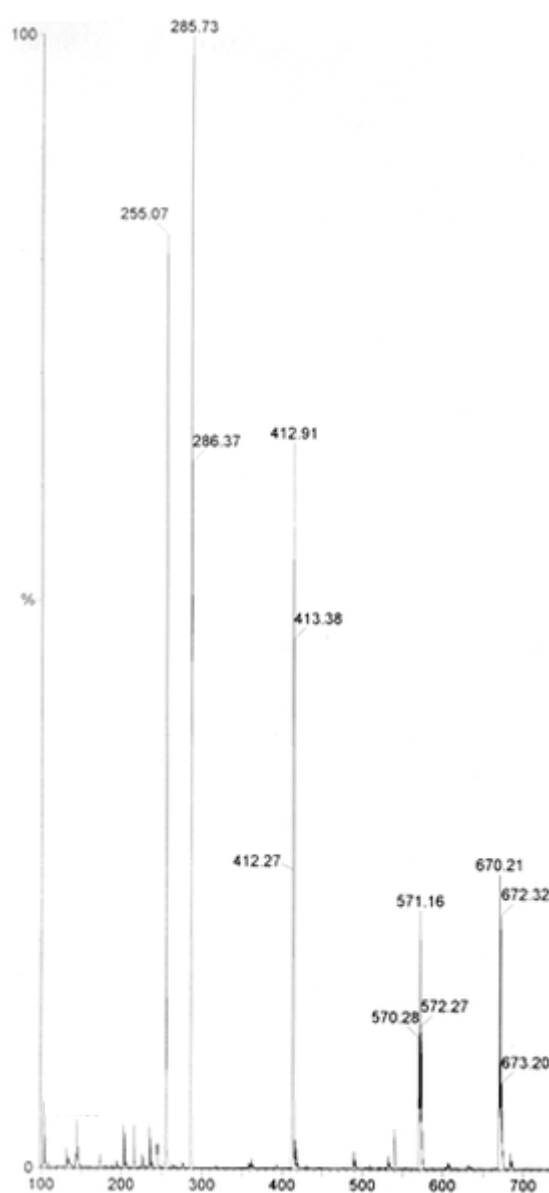
C3**C4**

Figure 2.5. Spectres de masse des complexes **C3** et **C4**.

Au terme de cette première étude en solution, quelques remarques s'imposent. Les données que nous avons obtenues en spectrométrie de masse nous renseignent qualitativement sur le type de complexe rencontré en solution. Il ne s'agit pas ici de faire une étude quantitative, même si les abondances relatives reprises dans les différents tableaux de résultats sont indicatrices de la composition du milieu étudié.

En effet, les espèces neutres ne peuvent être observées par spectrométrie de masse. Dès lors, un ligand non ionisé ou un complexe neutralisé par des contre-ions comme des perchlorates peut passer inaperçu. De plus, il n'est pas exclu que les conditions d'ionisation, même très douces, favorisent l'apparition de certaines espèces, comme par exemple des complexes plus exotiques tels que ceux formés à partir de trois ligands organiques.

Néanmoins, cette étude de spectrométrie de masse nous a permis d'avancer dans la compréhension des activités biologiques des complexes C0-C4. Ainsi, nous avons montré que la structure cristalline de C02, susceptible d'inhiber la protéase du VIH-1, n'existe pas en solution, ce qui explique l'absence d'activité biologique. Par contre, on observe bien, dans des proportions diverses, les complexes C1, C2 et C4 existant à l'état cristallin. Ces complexes peuvent dès lors adopter le mode d'interaction avec la protéase proposé lors des études de mécanique moléculaire. Le complexe C3, par contre, n'a pu être cristallisé ; ce dernier a pourtant été clairement identifié sur le spectre de masse, même si ses proportions sont relativement faibles. *A priori*, on peut donc penser que les faibles quantités de complexe C3 existant en solution suffisent à provoquer l'inhibition de l'enzyme.

Afin d'affiner les tendances observées par spectrométrie de masse en solution, nous avons entrepris une caractérisation des différents complexes par résonance paramagnétique électronique.

2.2. L'évaluation par résonance paramagnétique électronique de la persistance des complexes dans les conditions des tests enzymatiques⁷⁰³

... l'influence du solvant sur la stabilité des complexes

La spectrométrie de masse nous a permis une première approche du comportement des complexes en solution. Ainsi, nous avons élucidé la cause de l'absence d'activité inhibitrice des complexes **C0**. D'autre part, ces résultats semblent confirmer l'existence en solution de complexes **C1-C4**, caractérisés par une géométrie leur permettant d'interagir avec la protéase. Cependant, afin d'établir des relations plus précises entre la structure de ces complexes et leur activité antienzymatique, il nous a paru intéressant de compléter ces résultats par l'éclairage d'une technique complémentaire : la résonance paramagnétique électronique (RPE).

En effet, la RPE est couramment utilisée pour caractériser les complexes possédant un centre paramagnétique comme le cuivre (II). Les spectres RPE permettent d'accéder à certaines informations structurales telles que la nature des ligands ou la géométrie des complexes. Cependant, ces données sont parfois délicates à interpréter. Par contre, une utilisation plus directe de cette technique consiste à obtenir "l'empreinte digitale" des composés étudiés afin d'en réaliser des études comparatives.

Il nous a semblé opportun de nous intéresser à la stabilité des complexes **C0-C4** dans les milieux utilisés lors des tests enzymatiques, en nous affranchissant des aléas du processus d'ionisation propres à la spectrométrie de masse que nous avons décrits dans le point précédent.

Nous avons, dès lors, entrepris en RPE une étude comparative du comportement des différents complexes selon qu'ils se trouvent dans du méthanol ou dans un tampon acétate 10^{-1} M fixant le pH à 5.5. Les échantillons de chaque complexe ont donc été solubilisés soit dans du méthanol, soit dans le tampon acétate, à une concentration de 10^{-3} M*. Afin de comparer le comportement de ces complexes avec celui de l'ion cuivrique libre, nous avons également étudié des solutions 10^{-3} M de perchlorate ou d'acétate de cuivre (II). Les spectres ont été pris à température ambiante après avoir introduit les solutions dans une cellule de quartz plate permettant de minimiser l'écrantage dû au solvant⁶²³. Nous présentons ci-dessous les résultats de RPE relatifs

* Les spectres de **C2**, **C3** et **C4** faiblement solubles dans le tampon acétate ont été pris à une concentration de 5.10^{-4} M.

aux complexes SETCEZ et **C0**, puis aux complexes **C2**, **C3** et **C4**, et enfin au complexe **C1**.

L'influence du solvant ne se fait pas sentir sur l'allure des spectres des complexes SETCEZ et **C01-02**. On observe un signal identique pour les trois composés, que ce soit dans du méthanol ou dans le tampon acétate. Cette ressemblance traduit un mode de complexation commun à SETCEZ et aux complexes **C0**, à savoir l'implication d'un seul ligand tridentate, comme semblent l'indiquer les études de spectrométrie de masse. Pour éviter toute redondance, seul le spectre de SETCEZ dans le méthanol a été repris à la figure 2.6, les autres spectres se trouvant en annexe.

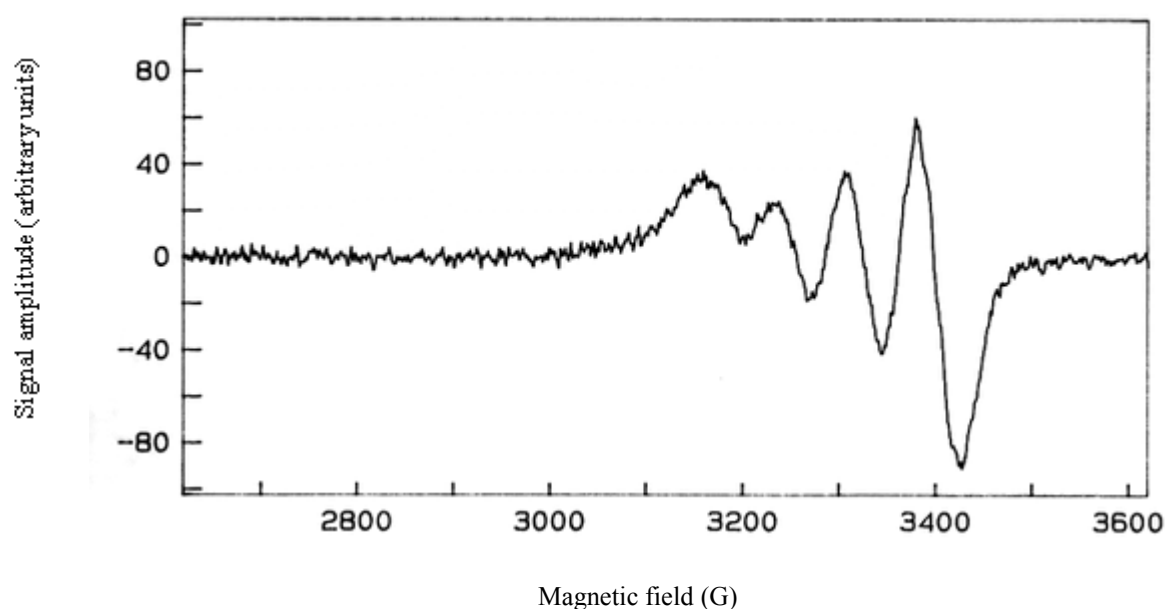


Figure 2.6. Spectre RPE à température ambiante de SETCEZ en solution dans du méthanol (10^{-3} M). Le signal est identique dans le tampon acétate.

Par ailleurs, si dans le méthanol, les complexes **C2**, **C3** et **C4** sont caractérisés par un signal propre, dans le tampon acétate, on observe des spectres similaires pour chaque complexe avec une seule bande large centrée vers 3300 G. La comparaison avec le spectre de l'acétate de cuivre (II) est particulièrement intéressante (Figure 2.7.). En effet, l'acétate de cuivre engendre exactement le même signal que ces complexes. L'interprétation de ce phénomène est claire : les complexes **C2**, **C3** et **C4** sont instables dans les conditions des tests enzymatiques ; une décomplexation se produit conduisant à une libération totale des ions cuivriques dans le milieu. L'activité inhibitrice de **C2** et **C3** ne peut dès lors être attribuée à l'action du complexe métallo-organique.

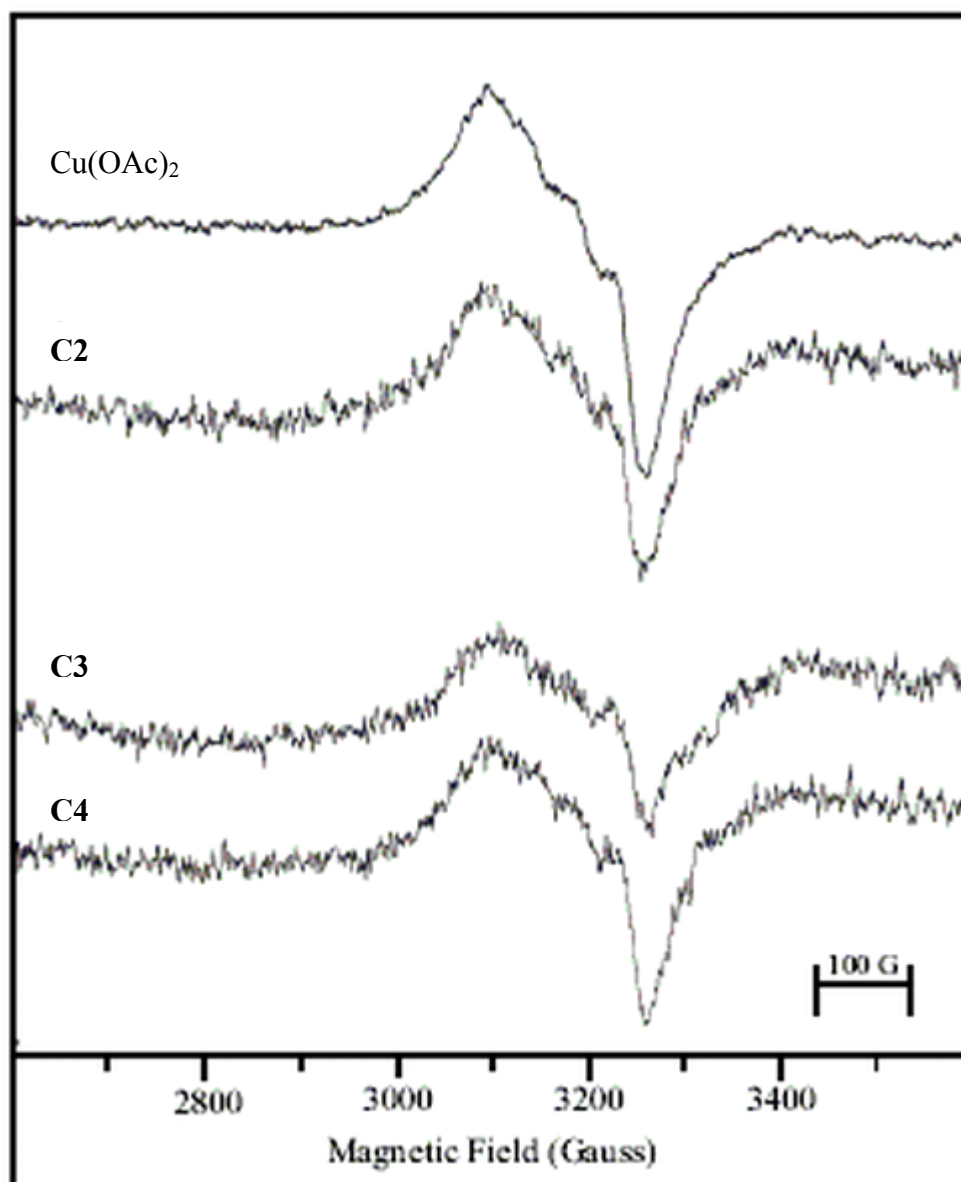


Figure 2.7. Comparaison des spectres RPE de l'ion cuivrique libre, ainsi que des complexes C2, C3 et C4, pris à température ambiante dans le tampon acétate 10^{-1}M à pH 5.5. On peut remarquer la similarité des différents signaux.

Par contre, si C1 est bien caractérisé par un signal propre dans le méthanol, son comportement dans le tampon acétate diffère de celui du cuivre (II) libre (Figure 2.8.). Le profil RPE de C1 présente cependant certaines similitudes avec celui de l'ion cuivrique, ce qui laisse à penser qu'une décomplexation partielle de C1 pourrait être observée. Le spectre de C1 résulterait, dès lors, de la superposition de deux signaux distincts : celui du cuivre libre et celui du complexe observé en cristallographie. Afin de mieux percevoir ce phénomène, nous avons soustrait au spectre total la composante du signal due à l'acétate de cuivre (Figure 2.9.a.).

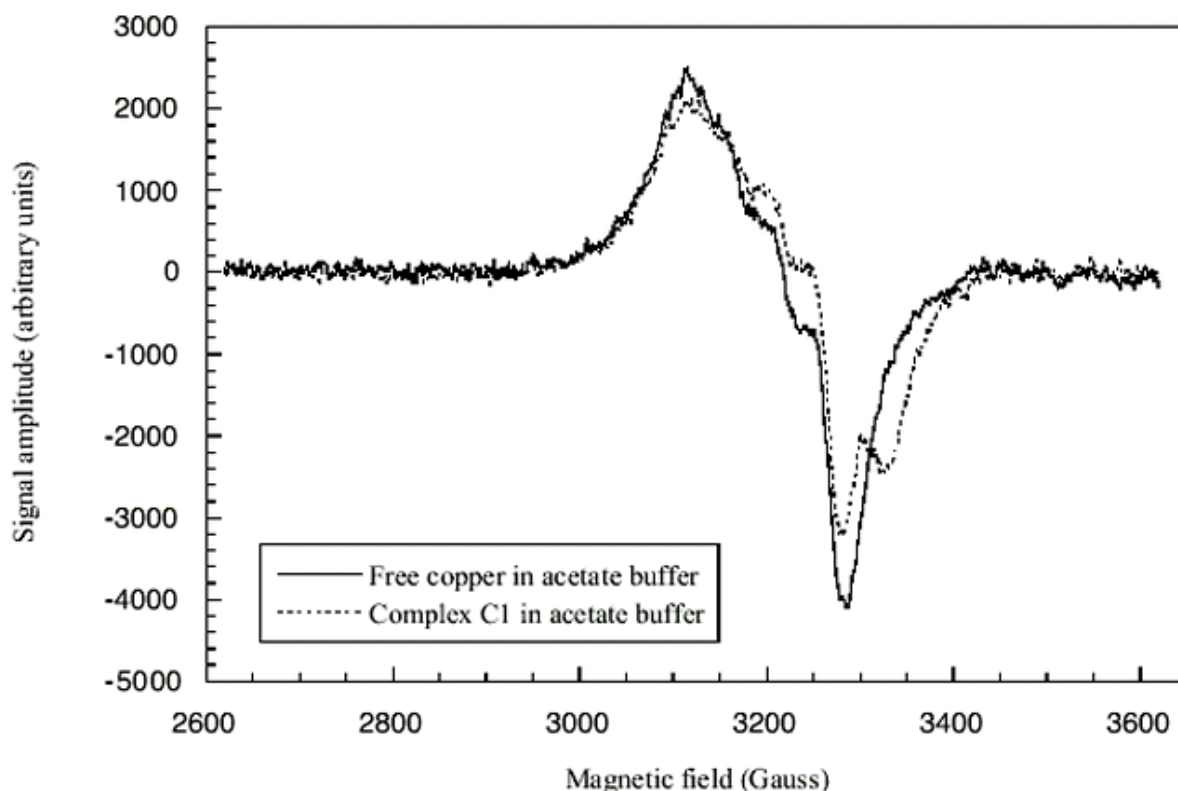


Figure 2.8.: Comparaison entre le spectre RPE de l'ion cuivrique libre (ligne continue) et celui de C1 dans le tampon acétate, à température ambiante.

Le signal résultant de cette simulation est caractérisé par deux bandes principales localisées entre 3000 et 3500 G, typiques de ce genre de complexes au cuivre (II)⁷⁰⁴. Lorsqu'on le compare à celui de C1 pris dans le méthanol (Figure 2.9.b.), on observe presque le même profil, totalement différent de celui du cuivre libre.

On peut donc affirmer, à ce stade de notre travail, que C1 subsiste sous forme de complexe dans le milieu utilisé lors des tests enzymatiques, même si on ne peut négliger un phénomène de décomplexation partielle. L'activité inhibitrice de C1 peut donc, du moins en partie, être attribuée au complexe observé en cristallographie dont nous avons modélisé l'interaction avec la protéase par mécanique moléculaire. Par contre, les complexes C2, C3 et C4 ne sont pas suffisamment stables pour garder leur intégrité dans le tampon acétate. Leur décomplexation conduit à la libération de leurs ligands respectifs dans le milieu ainsi qu'à celle des ions cuivrique au bénéfice des acétates présents dans le tampon. Dès lors, l'activité inhibitrice de ces complexes pose question.

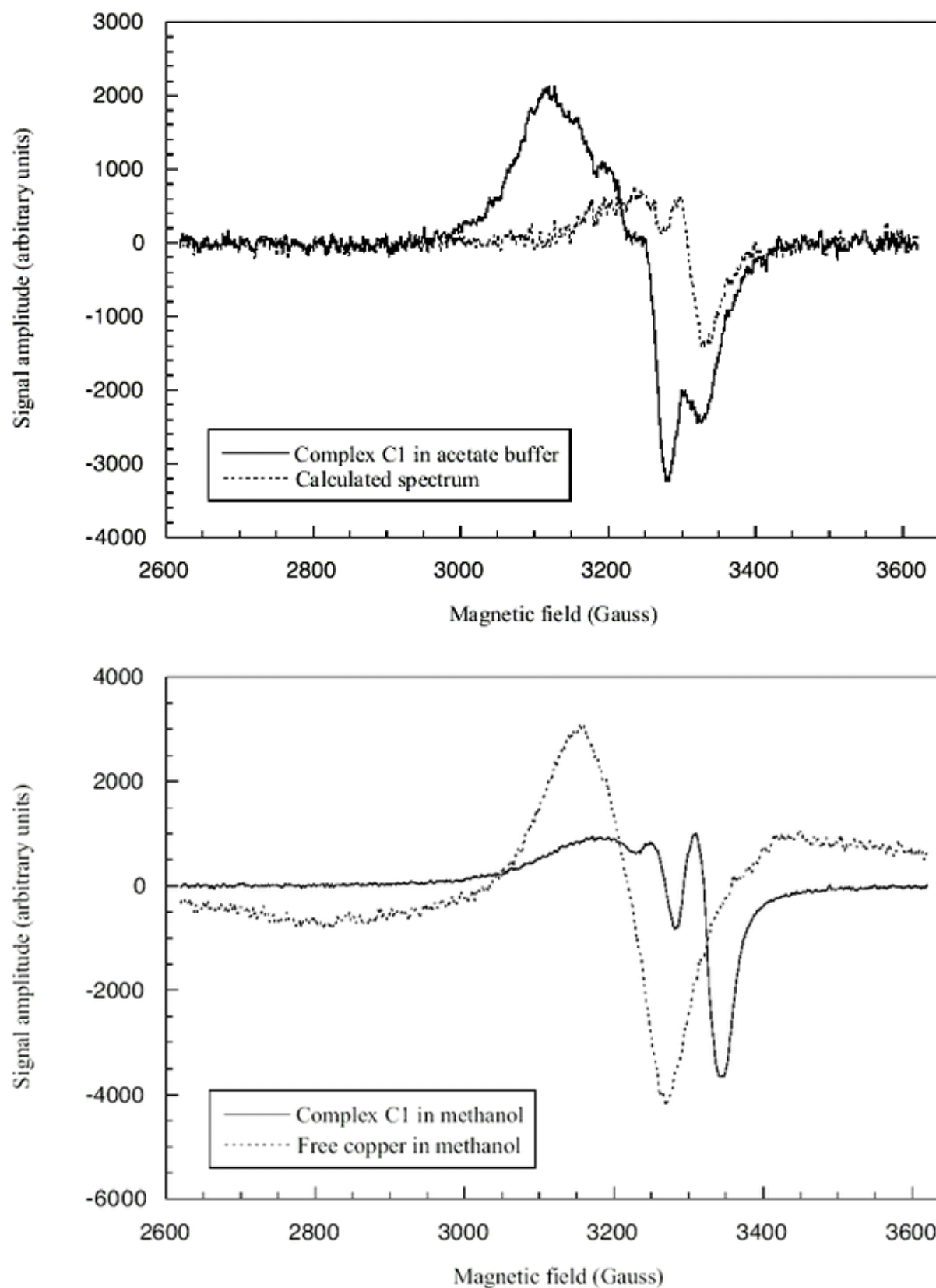


Figure 2.9. a. Spectre RPE de **C1** dans le tampon acétate (ligne continue). Le spectre simulé, en pointillé, résulte de la soustraction de la composante du signal due à l'ion cuivrique libre. b. Superposition des spectres RPE de **C1** et de l'acétate de cuivre dans le méthanol. Le spectre simulé en a est semblable à celui de **C1** dans le méthanol.

... la confrontation aux données biologiques

Si l'activité antiprotéolytique de **C2** et **C3** ne peut être attribuée aux complexes formés par deux ligands bidentates et l'ion cuivrique, deux explications peuvent être envisagées. La première consisterait à considérer que ce sont les ligands **L2** ou **L3** qui sont inhibiteurs de la protéase. Cette hypothèse est cependant infirmée : en présence d'EDTA, le cuivre (II) est en effet déplacé, libérant les ligands dans le milieu. Dans ces conditions, aucune activité inhibitrice n'est observée.

La seconde hypothèse fait porter la responsabilité de l'inhibition à l'ion cuivrique libre. Nous avons vu dans le deuxième chapitre de l'introduction générale (pp. 63-65) que les ions cuivriques et mercuriques inhibent l'activité protéolytique de la protéase en agissant au niveau des cystéines 67/167 et 95/195 localisées respectivement en surface de l'enzyme et à l'intérieur de l'interface de dimérisation^{450, 451}. Deux pistes sont envisagées pour expliquer cette inhibition : l'ion cuivrique pourrait soit oxyder ces cystéines, soit s'y lier. Dans le premier cas, la création de ponts disulfures mènerait à l'agrégation des protéases entre elles et à leur précipitation^{442,452,453}. Dans le second cas, la liaison du cuivre (II) aux cystéines se répercuterait sur toute la structuration de l'enzyme. Une déformation allostérique pourrait mener, de proche en proche, à la déstabilisation du complexe enzyme/substrat^{126,454}. Quoiqu'il en soit, les deux mécanismes mènent à une inactivation dépendant du temps. Ce type d'inhibition, dépendant du temps, avait été mis en évidence lors des expériences de cinétique menées au laboratoire d'enzymologie moléculaire et fonctionnelle du Professeur M. Reboud-Ravaux. Dès lors, il nous a semblé fort probable que l'inhibition de la protéase soit due aux ions cuivriques libérés dans le milieu.

Afin de vérifier le rôle joué par les ions cuivriques, l'équipe du Professeur Reboud a entrepris de tester en parallèle l'activité des complexes **C1-C4** et celle de l'ion cuivrique libre. Pour travailler en conditions optimales, les tests ont été réalisés à pH 6.5 dans un tampon phosphate. Ces nouvelles données biologiques concordent avec les résultats que nous avons obtenus en RPE.

En effet, les courbes d'inhibition des complexes **C2**, **C3** et **C4** se superposent parfaitement à celle du CuCl_2 obtenue dans les mêmes conditions (Figure 2.10.). On observe donc clairement l'inhibition due à la libération des ions cuivriques dans le milieu suite à la décomplexation de **C2**, **C3** et **C4**.

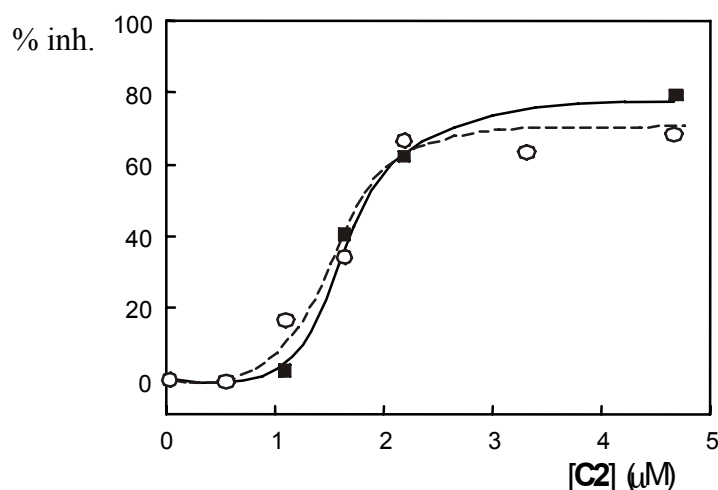


Figure 2.10. Inhibition de la protéase du VIH-1 (22.7 nM) par **C2**, symbolisé par des cercles blancs, et par CuCl_2 , symbolisé par des carrés noirs. Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0.025 M, pH 6.5, 303°K. Les deux courbes se superposent parfaitement.

Par contre, l'inhibition de la protéase du VIH-1 par **C1** conduit à une courbe sigmoïdale distincte de celle de CuCl_2 (Figure 2.11.). Ceci démontre que l'inhibition observée pour **C1** peut être attribuée à deux phénomènes. D'une part, la décomplexation partielle de **C1** induit la libération d'ions cuivriques dans le milieu. Ces ions inactivent l'enzyme selon un mécanisme dépendant du temps. D'autre part, **C1** subsiste partiellement sous forme de complexe. C'est ce complexe qui provoque l'inhibition compétitive de la protéase.

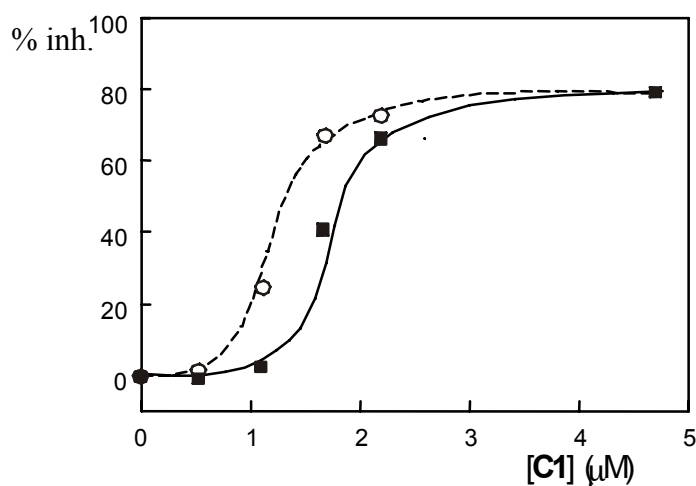


Figure 2.11. Inhibition de la protéase du VIH-1 (22.7 nM) par **C1**, symbolisé par des cercles blancs, et par CuCl_2 , symbolisé par des carrés noirs. Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0.025 M, pH 6.5, 303°K. L'inhibition due à **C1** est distincte de celle du cuivre (II) libre.

Une estimation des valeurs de K_i caractérisant l'interaction entre la protéase et **C1** sous forme de complexe, d'une part, et l'ion cuivrique libre, d'autre part, a pu être réalisée à partir des données de cinétique : le complexe **C1** et le cuivre (II) libéré suite à sa décomplexation ont tous deux des constantes d'inhibition d'environ 1 μM .

Par ailleurs, nous avons vu que les ions cuivriques inactivent la protéase en agissant au niveau des cystéines 67/167 et 95/195. Dès lors, une protéase

recombinante, dont les cystéines ont été mutées en alanines, ne devrait pas subir l'effet de ces ions cuivriques, tout en conservant une structuration et une activité enzymatique identique à celle de la protéase sauvage. Il a donc semblé intéressant de confirmer ces résultats en testant chaque complexe vis-à-vis de la protéase mutée*.

Comme nous nous y attendions, **C1** conserve une activité inhibitrice sur la protéase mutée (>20% à une concentration en **C1** d'environ 1.7-2.0 μM), alors qu'aucun effet inhibiteur n'est observé pour le cuivre (II) aux mêmes concentrations. Contrairement à **C1**, les complexes **C2**, **C3** et **C4** ne présentent aucune activité inhibitrice sur la protéase mutée, dans une gamme de concentration allant de 0.5 à 5.0 μM . Ces résultats sont en accord avec les travaux de Karlström et Levine. Ceux-ci ont démontré que seuls des complexes au cuivre (II), et non les ions cuivriques libres, pouvaient inhiber la protéase mutée, en agissant de manière compétitive au niveau du site actif de l'enzyme⁴⁵⁰.

Ces données biologiques complémentaires permettent d'éclairer sous un jour nouveau les résultats que nous avons obtenus lors de la caractérisation par RPE des complexes **C1-C4** en solution. Elles montrent que seul **C1**, subsistant partiellement sous forme de complexe dans le milieu utilisé lors des tests enzymatiques, est apte à inhiber la protéase de manière compétitive. **C2**, **C3** et **C4** ne sont pas suffisamment stables pour persister sous forme de complexe dans ce milieu. Ils libèrent leur ions cuivriques qui inactivent l'enzyme en agissant au niveau des cystéines.

* La protéase mutée est un don du Dr D.A. Davis (NIH, Bethesda, USA).

2.3. Conclusion

... les apports d'une caractérisation structurale en solution

Ce deuxième volet de résultats nous a permis de lever le voile sur l'origine de l'activité inhibitrice des complexes métallo-organiques que nous étudions. Ainsi, nous avons montré que les complexes formés à partir du ligand **L0** n'adoptent pas, en solution, une géométrie adéquate pour interagir avec la protéase. Parmi les espèces observées en solution, le mode de chélation tridentate semblable à celui de SETCEZ est favorisé. Dans certains cas, un deuxième ligand bidentate vient compléter la coordination, à l'image de la structure de **C01** obtenue en cristallographie, engendrant une gêne stérique au niveau des aspartates catalytiques lors de l'interaction avec la protéase.

Les complexes **C2**, **C3** et **C4** formés à partir de deux ligands bidentates de type quinoléine carboxamide étaient susceptibles d'inhiber compétitivement la protéase. Cependant, les études de RPE ont montré sans ambiguïté que, dans le tampon acétate utilisé lors des tests enzymatiques, un phénomène de décomplexation se produit menant à la libération complète des ions cuivriques dans le milieu. L'activité inhibitrice observée pour ces complexes peut, dès lors, être attribuée à l'action non compétitive des ions Cu^{2+} libres au niveau des cystéines 67/167 et 95/195. Ce phénomène a été confirmé par l'absence d'activité inhibitrice de ces composés vis à vis de la protéase mutée.

Enfin, le complexe **C1** fait preuve d'une stabilité suffisante pour persister partiellement sous sa forme complexée dans le tampon acétate. On peut considérer que son mécanisme d'inhibition présente deux facettes. Le complexe cristallographique formé de deux ligands bidentates se lie bien de manière compétitive au sein du site actif de l'enzyme ; mais la libération d'une certaine quantité d'ions cuivriques dans le milieu conduit également à une inhibition non compétitive.

Au-delà de la clarification des mécanismes d'action de cette nouvelle famille d'inhibiteurs, cette caractérisation expérimentale montre que l'étude du comportement en solution des complexes métallo-organiques est incontournable. Les stratégies de conception de médicaments classiques, portant sur de petites molécules organiques, peuvent généralement s'affranchir de cette étape. En effet, lorsque l'on dispose de la structure cristallographique d'une molécule organique à intérêt pharmaceutique, on peut assimiler cette structure à celle existant en solution, moyennant quelques

adaptations mineures comme, par exemple, des réarrangements conformationnels ou des protonations. Par contre, la caractérisation structurale de complexes métallo-organiques ne peut se contenter des études de DRX. Une structure cristallographique d'un complexe démontrera la possibilité de former ce complexe dans un champ cristallin. Elle ne donnera par contre aucune indication sur les espèces présentes en solution qui pourront, en outre, varier suivant le milieu étudié.

Cependant, il faut insister sur la complémentarité des études expérimentales que nous avons menées, que ce soit à l'état cristallin ou en solution. Elles apportent chacune leur éclairage au problème étudié et toutes présentent des limites dont il faut prendre compte dans son analyse. Comme nous venons de le dire, les techniques de DRX ne permettent pas d'appréhender la distribution des espèces complexées rencontrées en solution. C'est pourtant grâce à ces études que nous connaissons la structure tridimensionnelle de **C1**, qui a servi de point de départ à la modélisation de son interaction avec la protéase.

Les études de spectrométrie de masse à ionisation par électrospray illustrent bien qu'en solution, de nombreuses espèces différentes, ligands comme complexes, se côtoient en proportions variées. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que la méthode d'ionisation, même douce, entraîne quelques biais. Ainsi, les molécules neutres, non ionisées sont indétectables ; le phénomène complexe d'ionisation risque, en outre, de provoquer la rupture de certaines liaisons ligand/métal, ou, au contraire, de favoriser la formation de complexes plus exotiques, impliquant par exemple un nombre inhabituel de ligands. Compte tenu de ces limites, nous avons effectué dans ce chapitre une étude qualitative de la composition moléculaire de la solution, les intensités des pics ne reflétant que d'une manière indicative les proportions relatives de chaque espèce.

La RPE apporte de précieux renseignements sur la stabilité des complexes dans les tampons utilisés lors des tests enzymatiques. Cependant, nous sommes consciente que les spectres présentés ici ont une résolution assez faible, qui interdit toute analyse structurale poussée, comme la détermination des facteurs g ou des constantes de couplage A . Pour surmonter ce problème, il aurait fallu, soit travailler à plus haute concentration, ce que la faible solubilité des composés interdisait, soit entreprendre des études à basse température. Comme nous disposions des informations souhaitées, nous permettant d'interpréter les données biologiques, nous avons préféré reporter ce travail expérimental assez lourd.

...la stabilité des complexes métallo-organiques, une propriété incontournable

A l'issue de ce chapitre, il apparaît que si on se tourne vers la conception de complexes métallo-organiques à visée thérapeutique, il est indispensable de prendre en compte leur stabilité. Le terme stabilité est en lui-même assez vague. Avant de poursuivre cette discussion, il est bon de redéfinir brièvement sa signification.

On distingue généralement la stabilité thermodynamique d'un complexe de sa stabilité cinétique^{698,705}. La première fait appel aux notions thermodynamiques telles que l'enthalpie libre du système. Ainsi, dire qu'un complexe est stable dans un tampon particulier signifie qu'aucune réaction avec un composant de ce tampon (solvant, contre-ion, ...) n'est susceptible de diminuer l'enthalpie libre du système. La stabilité thermodynamique d'un complexe ML_n est caractérisée par une constante de stabilité (ou de formation) globale $\beta_n = [ML_n]/[M][L]^n$ qui est en fait le produit des constantes de formation partielles (K_1, \dots, K_n) correspondant à l'ajout successif de n ligands sur le centre métallique.

Par contre, la stabilité cinétique porte, comme son nom l'indique, sur la vitesse à laquelle le système va évoluer pour atteindre un nouvel état d'équilibre. On trouve à ce niveau la notion de complexe labile ou inerte : un complexe labile est un complexe dont les ligands seront rapidement échangés*. Au cours de ce travail, nous n'aborderons la stabilité des complexes que sous leur aspect thermodynamique.

Les études de RPE ont montré que seuls les complexes suffisamment stables étaient susceptibles d'inhiber compétitivement la protéase. La libération des ions cuivriques provoque un phénomène d'inhibition non compétitive au niveau des cystéines de l'enzyme, mais ce type d'inhibition est difficilement optimisable, puisqu'il est impossible de proposer des modulations structurales au niveau des ligands. En outre, il faut rappeler qu'en milieu physiologique, la concentration de Cu^{2+} libre est très faible, ce qui permet d'éviter des dommages oxydatifs importants (voir également le chapitre 4 de l'introduction générale). Il existe en effet dans l'organisme une multitude d'espèces susceptibles de complexer le cuivre (II) libre ou d'entrer en compétition avec les ligands organiques qui forment le médicament potentiel. L'étude de la stabilité des complexes métallo-organiques à visée thérapeutique est donc incontournable et doit se faire en prenant compte des caractéristiques physico-

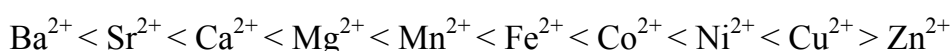
* On peut suivre facilement la vitesse de cet échange par l'utilisation d'isotopes marqués. Ainsi, une expérience courante consiste à mesurer la vitesse d'échange d'un ion métallique entre l'ion solvaté et le complexe : $ML_n + *M(H_2O)_n \rightleftharpoons *ML_n + M(H_2O)_n$.

chimiques du milieu étudié (conditions de pH, présence d'autres ligands complexant, etc..).

Si on compare la stabilité relative des différents complexes qui font l'objet de cette thèse, on se rend compte que dans le tampon cinétique SETCEZ, inhibiteur purement compétitif⁴⁸³, est plus stable que **C1**, lui-même plus stable que **C2**, **C3** et **C4**. On peut dès lors se demander à quoi est due cette différence de comportement.

La stabilité thermodynamique des complexes de coordination est influencée par de nombreux phénomènes qui font l'objet de livres de référence spécialisés comme par exemple les références⁷⁰⁶ et ⁶⁸⁸. En voici quelques-uns.

La nature du métal joue un rôle important dans la stabilité des complexes : la série d'Irving-Williams permet une première approche de ce problème. Ces auteurs ont montré que pour un ligand donné, la stabilité des complexes avec les ions métalliques dipositifs évolue en fonction de la taille de l'ion, de son potentiel d'ionisation et de l'effet de stabilisation du champ des ligands:



On observe que la stabilité augmente progressivement et atteint un maximum pour l'ion cuivrique, ce qui dans notre cas est particulièrement favorable*.

La nature du ligand influencera également la stabilité du complexe formé⁷⁰⁷. Ainsi, on peut faire appel à la théorie de Pearson basée sur le concept d'acides et de bases durs et mous pour expliquer la plus grande affinité de certains éléments donneurs d'électrons (les ligands ou bases de Lewis) pour certains accepteurs d'électrons (les métaux ou acides de Lewis). Les ions métalliques durs sont ceux qui se comportent comme le proton dans leur liaison avec le ligand. Ils sont petits, souvent très chargés et leurs électrons de valence sont difficiles à déformer ou à enlever. Les ions métalliques mous sont gros, faiblement chargés ou possèdent des électrons de valence faciles à déformer ou à enlever. Ils se lient fortement aux ligands très polarisables qui possèdent souvent une affinité très faible pour le proton. De manière similaire, les ligands sont divisés entre ceux qui ne sont pas polarisables (les durs) et ceux qui sont polarisables (les mous). L'expérience montre, d'une manière générale, que les complexes les plus stables sont ceux qui sont formés par des acides durs et des bases dures ou par des acides mous et des bases molles⁷⁰⁸. Le cuivre (II) peut être considéré comme un acide intermédiaire entre les durs et les mous. Il présentera, dès

* Mais pas suffisant puisque les composés que nous étudions subissent un phénomène de décomplexation!

lors, une affinité pour les bases intermédiaires comme la pyridine, l'aniline ou l'ion nitrite. Notons que les complexes que nous étudions possèdent tous cette liaison favorable $\text{Cu}^{2+}/\text{pyridine}$.

Une stabilisation particulière observée dans nos complexes est due à ce qu'on appelle l'effet chélate : les complexes contenant des cycles chélatants sont en général plus stables que les complexes similaires sans cycle. L'origine de ce phénomène peut être compris si on retourne aux principes de la thermodynamique^{709,710}. Rappelons, en effet, qu'une constante d'équilibre, comme la constante de stabilité, est liée à la variation d'enthalpie libre :

$$-RT \ln K = \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

La contribution enthalpique influence peu l'effet chélate. Ce sont donc les effets entropiques qui vont contribuer à stabiliser les systèmes contenant des ligands multidentates. Une augmentation du désordre est associée à une augmentation concomitante de l'entropie. Un complexe possède dès lors une entropie plus faible que ses constituants séparés et donc indépendants. Si on compare la libération de deux ligands monodentates par rapport à celle d'un seul ligand bidentate, on se rend compte que l'augmentation du désordre sera plus grande dans le premier cas. Le phénomène de décomplexation est donc favorisé dans le cas de ligands monodentates. A l'inverse, c'est une stabilisation supplémentaire qui est observée lors de la complexation du ligand bidentate. On peut faire une interprétation plus intuitive de ce phénomène. Lorsqu'une seule extrémité d'un ligand bidentate est coordonnée, la concentration effective de l'autre extrémité dans le système, et donc la probabilité qu'elle se lie au métal, sont élevées, car cette extrémité est contrainte de rester près du cation. Ces explications sont toutes deux assez simplistes au vu de la complexité de la thermodynamique impliquée dans la chélation, mais permettent une première approche assez efficace du phénomène.

L'effet chélate varie avec la taille du cycle formé par coordination. Contrairement aux cycles organiques, les cycles chélates les plus stables sont généralement les cycles à cinq membres plutôt que les cycles à six membres. En effet, l'atome métallique est plus gros que l'atome de carbone et les angles de chélation (L-M-L) autour du métal sont de 90° dans les complexes plan carré et octaédriques, contre un angle optimum de 109.5° pour le carbone tétraédrique. Dans un cycle chélate à cinq membres, les valeurs des différents angles de valence se rapprocheront, dès lors, plus des valeurs idéales que dans un cycle à six membres. Pour les cycles à six membres présentant des effets de résonance significatifs, une stabilisation

supplémentaire est observée. Ces règles ne sont cependant pas universelles. De nombreuses exceptions existent comme en témoigne, par exemple, la référence ⁷¹¹.

Dans le cas des complexes que nous étudions, **C1** qui présente des cycles chélates à six membres est plus stable que **C2**, **C3** et **C4** caractérisés par des cycles chélates à cinq membres. Cela peut paraître contradictoire à ce que nous venons d'énoncer. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que d'autres effets peuvent intervenir dans la stabilisation des complexes. Nous étudierons en détail les différentes contributions à la stabilité de **C1** et **C2** dans le chapitre suivant.

D'un point de vue entropique, la conformation adoptée par les ligands entre également en compte dans la stabilisation du complexe⁷¹². En effet, quand un ligand rigide non complexé se trouve dans une conformation préorganisée pour la complexation, le coût énergétique nécessaire à son réarrangement lors de la chélation est nul. Cette préorganisation peut, en outre, apporter une sélectivité vis-à-vis de certains métaux, de certaines géométries et même favoriser un étage d'oxydation par rapport à un autre. Les ligands rigides, orientant correctement les atomes impliqués dans la chélation, favoriseront donc la formation de complexes plus stables.

On peut ainsi prendre l'exemple de SETCEZ dont le ligand libre adopte la même conformation que lorsqu'il est complexé. Cette conformation est, en effet, stabilisée par la formation de deux ponts H intramoléculaires entre les azotes pyridiniques et le proton de l'azote central. D'après nos résultats expérimentaux, SETCEZ reste bien sous forme de complexe en solution; il présente donc une stabilité plus élevée que les autres complexes qui doivent subir un réarrangement conformationnel avant leur complexation.

Enfin, la nature même des ligands va influencer la stabilité des complexes. Différents effets stéréoelectroniques peuvent mener à l'enrichissement de la densité électronique au niveau du site de chélation. Si on considère le complexe **C1**, on peut s'attendre à un effet électrodonneur des méthoxys substituant le cycle triméthoxyphényle qui stabiliserait son interaction avec le Cu^{2+} .

Nous voyons donc que de nombreux facteurs peuvent influencer la stabilité des complexes métallo-organiques. Lors de la conception de composés de coordination à visée thérapeutique, comme ceux que nous étudions dans le cadre de l'inhibition de la protéase du VIH-1, il est indispensable de rechercher des molécules suffisamment stables pour agir en tant que complexes. Afin de dégager les critères nécessaires à

l'obtention de complexes stables, il est intéressant de se tourner vers des méthodes théoriques prédictives. Alors que la mécanique moléculaire classique ne permet pas l'évaluation de propriétés énergétiques fines telles que celles qui interviennent lors du processus de complexation, et que la mécanique quantique peut s'avérer extrêmement coûteuse en temps de calcul, l'approche des champs de forces polarisables offre une alternative intéressante.

A cet effet, nous consacrerons la dernière partie de cette thèse à l'adaptation de la méthode SIBFA (*Sum of Interactions Between Fragments Ab initio computed*), développée par le docteur N. Gresh, aux complexes au cuivre (II) que nous étudions. Nous verrons que cette procédure met en évidence certains effets stéréoelectroniques à l'origine de la meilleure stabilité de **C1**. D'une manière plus générale, nous montrerons qu'il est possible d'envisager, avec SIBFA, une approche prédictive de la stabilité de tout complexe au cuivre (II).

3. Evaluation théorique des propriétés énergétiques de complexes au cuivre(II) par la méthode SIBFA⁶⁶⁴

Au cours du chapitre précédent, nous avons vu que, pour développer des complexes métallo-organiques à visée thérapeutique, il était crucial d'en étudier la stabilité thermodynamique. Ainsi, dans le cas de nos travaux sur l'inhibition de la protéase du VIH-1 par des complexes au cuivre, les techniques expérimentales de spectrométrie de masse et de résonance paramagnétique électronique ont permis de montrer, de manière indirecte, que seul **C1** est susceptible de persister sous sa forme complexée en proportion suffisante pour inhiber compétitivement la protéase.

La stabilité thermodynamique d'un complexe peut être quantifiée plus directement par la détermination des constantes de stabilité. Dans le cas simple où un seul complexe, de formule empirique connue, est formé, la mesure de la concentration en ions métalliques et en ligands non complexés est suffisante pour déterminer la constante de formation. Il existe plusieurs méthodes, spectroscopiques ou non, pour réaliser ces mesures⁷¹³. Cependant, dans le cas plus général où il faut déterminer une série de constantes de formation pour avoir accès à la constante de stabilité globale du système, comme dans le cas des complexes que nous étudions, le problème est plus difficile. On utilise alors des méthodes spectrophotométriques ou potentiométriques couplées à des logiciels informatiques spécialisés pour déterminer à la fois les constantes de formation des complexes et les constantes de stabilité⁶⁹⁸.

Parallèlement à ces mesures expérimentales, il est intéressant de disposer de méthodes prédictives donnant un aperçu, *in silico*, de la stabilité relative d'une série de complexes tels que ceux qui font l'objet de cette étude. En l'absence de l'expertise et de l'équipement requis pour déterminer les constantes de stabilité empiriques des complexes **C0-C4**, nous nous sommes focalisée, au cours de cette thèse, sur l'évaluation théorique de cette propriété.

Dans cette optique, les méthodes de calcul classiques, de mécanique quantique ou de mécanique moléculaire, présentent de sérieuses limitations. Ainsi, comme nous l'avons dit dans le chapitre dédié aux matériels et méthodes, la mécanique quantique est rapidement trop coûteuse en temps de calcul lorsque la taille du système dépasse quelques dizaines d'atomes et qu'il faut inclure des effets de solvant ou de corrélation électronique. Par ailleurs, la mécanique moléculaire classique permet d'approcher l'aspect structural des complexes mais s'avère impuissante à modéliser des propriétés

électroniques fines telles que celles impliquées dans les phénomènes de complexation et de stabilisation des complexes métallo-organiques.

Les champs de forces polarisables peuvent être considérés comme une des alternatives à ces limitations^{*}. Parmi les différentes approches possibles, la méthode SIBFA nous a semblé adéquate pour traiter ces problèmes de stabilité. En effet, cette procédure a porté ses fruits dans le domaine de la modélisation de systèmes comportant des espèces métalliques tels que le zinc, le calcium, le magnésium ou le cadmium. Elle permet en outre de traiter des systèmes macromoléculaires comme les protéines.

En collaboration avec le concepteur de cette méthode, le Dr N. Gresh^{**} ainsi qu'avec le Dr C. Giesner-Prettre^{***}, nous avons adapté la procédure aux complexes au cuivre(II) et nous l'avons appliquée aux complexes qui font l'objet de cette étude.

Ce troisième chapitre est, dès lors, consacré à la modélisation des complexes au cuivre (II) par la méthode SIBFA. Dans un premier point, nous présenterons son paramétrage et sa validation pour l'étude de l'interaction de Cu^{2+} avec différents ligands types. Nous montrerons ensuite que la méthode SIBFA est apte à reproduire la géométrie des complexes octaédriques au cuivre (II). Dans un second temps, nous ferons le point sur les propriétés énergétiques de ces complexes. Nous verrons que SIBFA permet de prévoir les stabilités relatives des complexes **C1** et **C2** ; nous investiguerons plus particulièrement les facteurs structuraux provoquant une meilleure stabilisation de **C1**. Enfin, nous parlerons des nombreuses perspectives que cette méthode originale ouvre, tant dans le domaine de la modélisation des complexes au cuivre, que dans celui de systèmes protéiques incluant des centres métalliques tels que la protéase du VIH-1 en interaction avec le complexe **C1**.

^{*} Pour une description plus approfondie des champs de forces polarisables et en particulier de la méthode SIBFA, voir aussi le point 2.3. du chapitre 'matériel et méthodes' et les références qu'il contient.

^{**} Laboratoire de Pharmaco-Chimie Moléculaire et Structurale, Université René Descartes, Paris.

^{***} Laboratoire de Chimie Théorique, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

3.1. La modélisation des complexes au cuivre(II) par la méthode SIBFA

... l'adaptation de la procédure aux complexes au cuivre(II)

Dans le cadre d'une collaboration avec les Dr N. Gresh et C. Giessner-Prettre, une adaptation de la méthode SIBFA aux complexes au cuivre(II) a été entreprise. Dans un souci de clarté, nous présentons ici brièvement la démarche suivie pour y arriver.

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre consacré aux matériel et méthodes, SIFBA, par l'approximation du 'rotor rigide', considère les molécules comme un ensemble de fragments rigides indépendants, bougeant les uns par rapport aux autres. Le temps économisé en supprimant les termes de déformation de liaisons et d'angles permet d'affiner l'évaluation de l'énergie attribuée aux interactions intermoléculaires (ou interfragmentales). Cette énergie et les différentes contributions énergétiques qui la composent peuvent être directement comparées à celles obtenues par calcul *ab initio* de haut niveau incluant ou non de la corrélation électronique.

Dès lors, le paramétrage de l'interaction Cu^{2+} /ligand est toujours suivi d'une étape de validation : les énergies obtenues suite aux minimisations en SIBFA sont systématiquement comparées à celles découlant de la décomposition de l'énergie d'interaction obtenue en mécanique quantique*. Rappelons, à ce propos, que les différentes contributions énergétiques prises en compte par la méthode SIBFA comprennent un terme électrostatique, E_{MTP} , un terme répulsif, E_{rep} , un terme de polarisation, E_{pol} , un terme de transfert de charge, E_{ct} , et un terme de dispersion E_{disp} .

$$E_{\text{inter}} = E_{\text{MTP}} + E_{\text{rep}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{ct}} + E_{\text{disp}}$$

Ainsi, les quatre premières contributions sont comparées à leurs homologues quantiques au niveau Hartree-Fock (HF), tandis que le terme de dispersion évolue parallèlement au gain d'énergie obtenu en incluant de la corrélation électronique dans les calculs *ab initio* (méthodes MP2 et/ou DFT**).

Le paramétrage de l'interaction Cu^{2+} /ligand a porté sur un certain nombre de petits ligands couramment rencontrés en chimie de coordination et chimie bio-inorganique. Dans un premier temps, l'étude s'est tournée vers des complexes formés à

* La procédure CSOV⁷¹⁴ (constrained space-orbital variation) permet une telle décomposition de l'énergie d'interaction calculée au niveau HF.

** Ces méthodes de mécanique quantique sont bien expliquées dans le livre d'A. Leach : '*molecular modelling, principles and applications*'^{624,715}.

partir de l'ion cuivrique et d'un seul ligand, neutre ou anionique. Ainsi, parmi les ligands choisis, on retrouve l'eau, le *méthanol*, l'acide formique, le *formamide*, l'imidazole, la *pyridine*, la *quinoléine*, de même que les anions hydroxyle, méthylthiolate, *formate* et *perchlorate*. Dans le cas du formate et du perchlorate, les modes de complexation monodentate et bidentate ont été envisagés. Remarquons que les molécules reprises en italique sont, en fait, les fragments constitutifs impliqués dans la chélation des complexes **C1-C2** et de leurs dérivés. Les énergies obtenues par SIBFA reproduisent assez fidèlement celles obtenues en mécanique quantique, avec une erreur relative inférieure à 3 %.

Dans un second temps, une étude de complexes formés à partir de plusieurs ligands a été entreprise. Dans ce cas, les ligands envisagés sont respectivement l'eau, le formate et le perchlorate. Les complexes étudiés comprenaient différentes combinaisons de ces ligands, comme, par exemple, l'ion cuivrique entouré de six molécules d'eau, ou de deux formates, ou encore de deux perchlorates et de quatre molécules d'eau. Les calculs quantiques donnent ici aussi des résultats en accord avec ceux obtenus par SIBFA, avec une erreur relative inférieure à 2.5 %.



Figure 3.1. Structure du complexe binucléaire $[\text{Cu}(\text{HCOO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]_2$ optimisée en SIBFA. Code des couleurs : Cu : jaune, C : vert, O : rouge, H : blanc .

Enfin, la modélisation d'un complexe binucléaire, comprenant deux ions cuivriques, $[\text{Cu}(\text{HCOO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]_2$, a été envisagée. De nouveau, les résultats obtenus sont bien en accord avec ceux de mécanique quantique (2.5% d'erreur relative). Notons que la structure obtenue suite à la procédure de minimisation est comparable à celle de l'acétate de cuivre à l'état cristallin, dont nous reparlerons dans le point suivant (Figure 3.1.).

L'étude par la méthode SIBFA de complexes formés à partir de plusieurs ligands présente cependant plusieurs limitations. Une des plus importantes provient de la nature particulière, en couche ouverte, de l'ion cuivrique. Nous avons vu dans le premier chapitre de résultats de cette thèse (pp. 148-153) que la configuration électronique en $3d^9$ du cuivre (II) est à l'origine de l'effet Jahn-Teller. Cet effet se traduit par une stabilisation de certaines géométries caractérisant les complexes formés à partir de l'ion cuivrique. On retrouve ainsi quasi exclusivement la géométrie octaédrique déformée tétragonalement et ses arrangements limites, lorsque les ligands s'éloignent trop pour conserver une liaison: la pyramide à base carrée et le plan carré.

La version initiale de SIBFA, que nous avons utilisée au cours de notre thèse, ne permettait pas de modéliser les effets dus au champ de ligands et donc de prendre en compte l'effet Jahn-Teller. Dès lors, seuls les complexes octaédriques étaient susceptibles d'être étudiés, tout en gardant à l'esprit que la déformation tétragonale ne serait pas rendue. En effet, si on prend l'exemple d'un complexe possédant quatre coordinations, les répulsions entre ligands vont favoriser une géométrie tétraédrique et non un plan carré, comme celui que l'on rencontrerait au sein d'un complexe au cuivre (II). Compte tenu de cette limitation, nous n'avons modélisé que les complexes **C1**, **C2** et leurs dérivés, réservant SETCEZ et les complexes **C0** à une étude ultérieure.

A l'heure actuelle, une version de SIBFA incluant dans la description de l'énergie d'interaction un terme supplémentaire pouvant rendre compte des effets de champ de ligands est en développement⁶⁵⁷. Les premiers résultats sont encourageants : la modélisation du cuivre hydraté $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, par exemple, montre bien une élongation des liaisons apicales (distances O-Cu : 1.99Å en équatorial et 2.17Å en axial) alors que la version que nous avons utilisée donne six distances identiques (2.06Å).

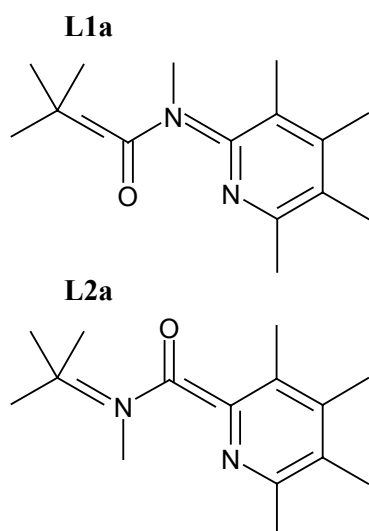


Figure 3.2. Fragments constitutifs des ligands **L1a** et **L2a**. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène et de carbone ne sont pas représentés par leur symbole atomique.

Après l'étape de paramétrage et de validation basée sur des complexes formés à partir de ligands monofragmentaux, il était utile de s'assurer que la méthode SIBFA reproduisait correctement les résultats de mécanique quantique lorsque l'on passait à l'étude de ligands plus volumineux constitués de plusieurs fragments. Comme un des objectifs initiaux de l'adaptation de SIBFA aux complexes au cuivre (II) portait sur la modélisation de **C1** et **C2**, nous avons choisi d'étudier des dérivés tronqués de ces deux complexes parallèlement par les méthodes SIBFA, HF et DFT.

Ces complexes tronqués, que nous avons appelés **C1a** et **C2a**, sont formés à partir de deux ligands **L1a** et **L2a** dont la composition fragmentale est reprise à la figure 3.2. On peut remarquer que ces ligands sont constitués exactement à partir des mêmes fragments, c'est-à-dire une molécule de pyridine, de formamide et de méthane,

la seule différence étant que dans le cas de **L1a**, la molécule de formamide est liée à la pyridine par l'azote amidique, tandis que dans le cas de **L2a**, c'est le carbone amidique qui assure la jonction. Lors de la constitution des complexes, nous avons placé, dans cette étape préliminaire de nos calculs, des molécules de formate en position apicale. Ces formates peuvent être assimilés à des molécules d'acétate tronquées.

Deux conformations distinctes de chaque ligand ont été prises en compte lors de leur interaction avec l'ion cuivrique (Figure 3.3.). Dans la première conformation, que nous qualifierons de *trans*, l'oxygène amidique se trouve en *trans* de l'azote pyridinique. La coordination se fait donc uniquement au niveau de cet azote et de celui d'un oxygène de l'anion formate. Quatre coordinations caractérisent donc les complexes **C1a-trans** et **C2a-trans**. Dans la seconde conformation, appelée *cis*, l'oxygène amidique et l'azote pyridinique sont en *cis* l'un par rapport à l'autre, et assurent donc tous deux la chélation au métal. Cet arrangement à six coordinations est celui que l'on observe pour **C1** et **C2** en cristallographie.

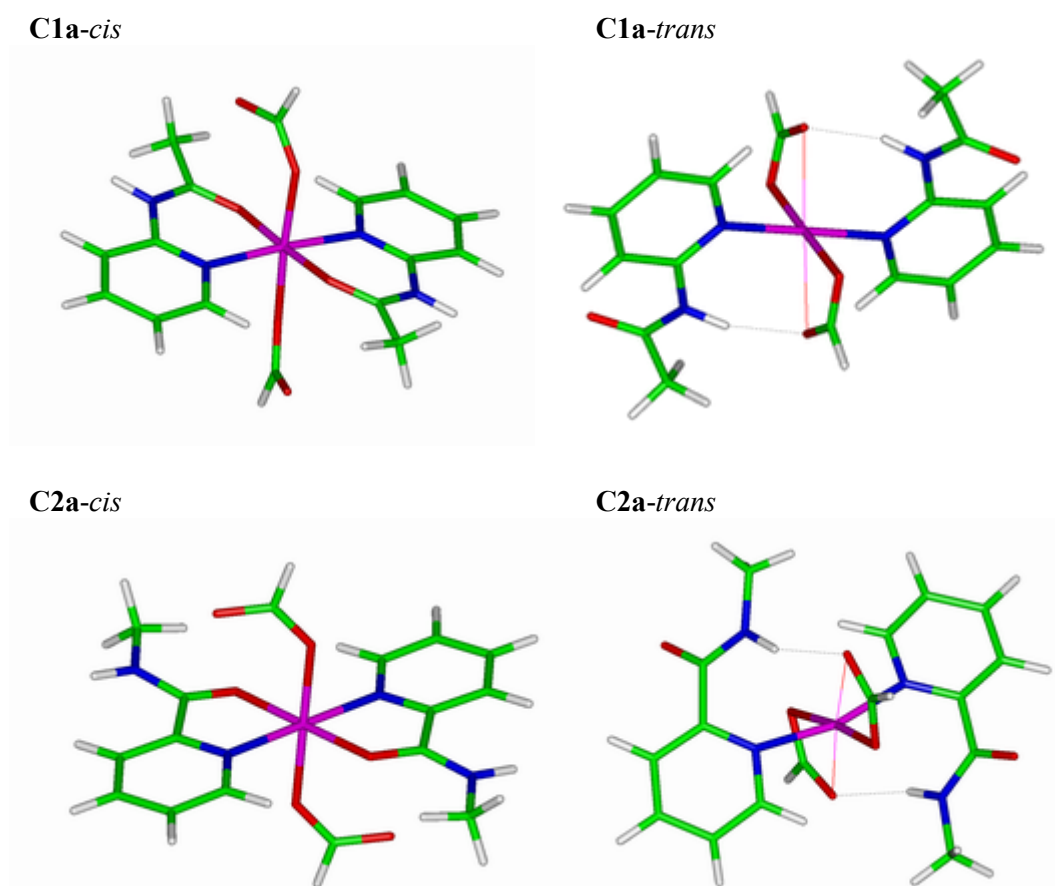


Figure 3.3. Structure de **C1a** et **C2a** dans leur arrangement *cis* et *trans* après leur optimisation en SIBFA. Pour les complexes *trans*, les pointillés noirs indiquent les ponts H intramoléculaires et les traits de couleur plus fins, la deuxième liaison entre le cuivre et l'anion formate. Code des couleurs : Cu : fuchsia, C : vert, O : rouge, N : bleu, H : blanc.

Les énergies correspondant à chaque complexe ont été obtenues suite à une procédure de minimisation dans le vide en SIBFA, en HF et en DFT. Pour tenir compte du coût énergétique de la réorganisation des ligands flexibles lors de leur complexation, l'énergie de ces ligands libres optimisés a été soustraite deux fois à celle du complexe. Les résultats obtenus montrent unanimement que **C1a** est plus stable que **C2a**, que ce soit selon l'arrangement *cis* ou *trans* (Tableau 3.1.). Lorsque l'on ne tient pas compte de la contribution de dispersion en SIBFA, les énergies reproduisent celles obtenues par HF avec moins de 2% d'erreur relative. Le passage à un niveau théorique incluant la corrélation électronique permet de rester dans une fourchette de 4 à 5% d'erreur.

Si on compare les énergies des conformations *cis* et *trans*, on remarque qu'aussi bien au niveau HF qu'en DFT, la conformation *trans* est la plus stable que ce soit pour **C1a** que pour **C2a**. Cette tendance se retrouve dans les résultats obtenus par SIBFA, à l'exception notable de l'énergie de **C1a** incluant le terme de dispersion. On touche dans ce cas aux limitations de la méthode, et plus particulièrement de la formulation de E_{disp} .

Tableau 3.1. Energies d'interaction intermoléculaire (méthodes SIBFA, HF et DFT) dans les complexes formés par l'ion cuivrique et les ligands tronqués **L1a** et **L2a** (kcal/mol). Les différentes contributions à l'énergie d'interaction de SIBFA sont également reprises.

	C1a-trans	C1a-cis	C2a-trans	C2a-cis
E_{MTP}	-634.2	-663.9	-626.3	-652.4
E_{rep}	103.0	117.4	103.7	112.6
E_{pol}	-83.6	-65.6	-91.3	-54.8
E_{ct}	-16.4	-10.9	-17.2	-10.8
E_{tor}	3.2	-2.1	6.4	1.8
$\Delta E(\text{SIBFA})^*$	-628.0	-625.1	-619.7	-603.5
$\Delta E(\text{HF})^{**}$	-640.1	-624.2	-623.7	-614.7
E_{disp}	-44.7	-51.6	-47.2	-46.8
$\Delta E_{\text{tot}}(\text{SIBFA})$	-672.7	-676.8	-666.9	-650.3
$\Delta E(\text{DFT})^{***}$	-703.5	-682.2	-694.5	-677.6

Energies d'interaction obtenues:

* sans tenir compte du terme de dispersion

** à partir des conformations optimisées en SIBFA

*** à partir des conformations optimisées en DFT

D'un point de vue structural, ces résultats sont assez ambigus. En effet, nous avons vu que la formation de cycles chélates, tels que ceux trouvés au sein de **C1** et **C2**, avait un effet stabilisateur du complexe. Or, les géométries les plus stables sont ici

celles qui impliquent une coordination de type monodentate. On peut attribuer, en partie, cette stabilisation à la formation de ponts hydrogène intramoléculaires entre les azotes amidiques protonés et les oxygènes des formates en positions apicales (Tableau 3.2.). Dans les arrangements *trans*, ces formates ont tendance à adopter un mode de complexation bidentate. En effet, le formate se positionne de manière à rapprocher du centre cuivrique l'oxygène qui n'était pas, à l'origine, impliqué directement dans la coordination (les distances sont respectivement pour **C1a-trans** 2.32 et 2.33 Å, et pour **C2a-trans** 2.23 et 2.53 Å). Notons que la tendance à stabiliser la conformation *trans* par rapport à la conformation *cis* est sans aucun doute tributaire de la présence de formates en positions apicales des complexes. L'eau n'aurait pas pu former de ponts hydrogène intramoléculaires avec l'azote amidique et ne permettrait pas une coordination de type bidentate avec l'ion cuivrique. Pour ces raisons, nous avons, dans les calculs énergétiques qui suivront, toujours considéré les complexes dans leur conformation *cis*, telle que celle que l'on observe par DRX.

Tableau 3.2. : Description géométrique des ponts H intramoléculaires stabilisant les conformations *trans* des complexes **C1a** et **C2a**.

complexe	distance N...O [Å]	distance H...O[Å]	angle N-H...O[°]
C1a-trans	2.84	1.88	160.04
	2.84	1.89	157.78
C2a-trans	2.79	1.84	152.77
	2.74	1.85	143.95

Ces résultats nous suggèrent l'hypothèse suivante : dans le processus de décomplexation de **C1** et **C2** en faveur des contre-ions acétates (mimés ici par des formates plus petits), ces derniers occupent tout d'abord les positions apicales en déplaçant les molécules d'eau initiales. Les acétates deviennent ensuite progressivement bidentates, ce qui provoque la perte de l'interaction entre l'oxygène amidique du ligand organique et l'ion cuivrique. Ces ligands organiques ne sont, dès lors, plus retenus que *via* la coordination assurée par l'azote pyridinique qui peut à son tour être déplacé, par exemple, par de l'eau. On se retrouve ainsi, *in fine*, avec de l'acétate de cuivre (II) hydraté et des ligands libres dans le milieu.

... l'analyse structurale des complexes **C1** et **C2**

A la suite de ces étapes d'adaptation de la méthode SIBFA aux complexes au cuivre (II) et de validation des résultats préliminaires par comparaison aux calculs quantiques, il était intéressant de voir dans quelle mesure la procédure permettait de reproduire des données cristallographiques. Notons que plusieurs champs de forces, dédiés pour la plupart à la chimie inorganique, sont aptes à prédire les aspects structuraux des complexes au cuivre^{634,635,637-639,716-719}. Ils ne donnent cependant pas accès aux propriétés énergétiques fines telles que celles que l'on peut modéliser par la méthode SIBFA.

A cette fin, nous avons construit, dans un premier temps, les ligands **L1** et **L2** à partir de leurs fragments constitutifs. La figure 2.4. du chapitre '*matériel et méthodes*' (page 120) illustre ces ligands. Nous avons ensuite organisé les différents ligands autour de l'ion cuivrique afin de reproduire les complexes **C1** et **C2** observés en cristallographie. Une procédure de minimisation d'énergie a été entreprise dans un champ continu mimant le milieu aqueux. Six variables intermoléculaires définissant la position d'approche de chaque partenaire au sein du complexe ont été considérées, de même que les angles de torsion situés à la jonction des fragments constituant les ligands.

Les géométries obtenues à l'issue de cette minimisation ont été comparées aux structures cristallographiques. Un RMS* inférieur à 0.3 Å a été calculé lors de la superposition des atomes lourds des deux types de structures (Figure 3.4.), témoignant de la capacité de SIBFA à reproduire les géométries expérimentales de tels complexes. Seuls les ligands apicaux et les groupements méthoxy substituant les noyaux benzéniques s'écartent quelque peu de la superposition.

Le tableau 3.3. reprend les principales caractéristiques géométriques des complexes **C1** et **C2** observés par modélisation et par cristallographie.

L'écart maximum entre les valeurs théoriques et expérimentales est de 0.16 Å pour les distances**, et de 3.86° pour les angles de valence. Les distances entre l'ion cuivrique et l'oxygène du méthanol ou du perchlorate en positions apicales sont sous-estimées. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, la version de SIBFA que nous avons utilisée ne tient pas compte de l'influence du champ des ligands et ne permet donc pas de modéliser les déformations tétraogonales typiques dues à l'effet Jahn-Teller.

* Le critère de RMS (Root Mean Square) permet d'évaluer la pertinence d'une superposition. Il est calculé suivant l'équation: $RMS = [\sum_{i \rightarrow N} ((x_i - x_i')^2 + (y_i - y_i')^2 + (z_i - z_i')^2)) / N]^{1/2}$.

** Si on ne tient pas compte des distances entre le cuivre et les ligands apicaux.

Certains champs de forces permettent une approche de ce phénomène⁷²⁰⁻⁷²⁴ et rendent, dès lors, mieux compte des caractéristiques géométriques des complexes au cuivre (II). Dans le processus de développement de la méthode SIBFA, l'inclusion d'un nouveau terme décrivant les effets du champ des ligands selon l'approche du modèle de recouvrement angulaire développé par R. J. Deeth, a donné de premiers résultats prometteurs⁶⁵⁷.

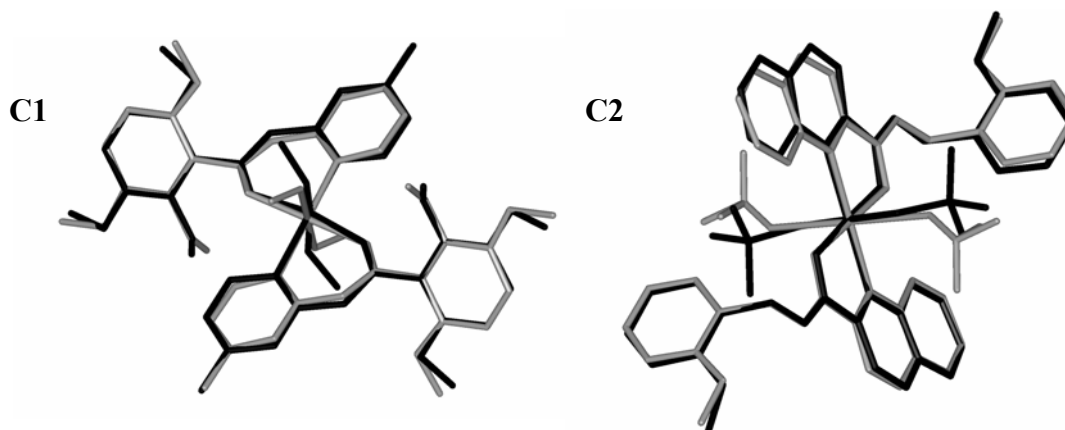
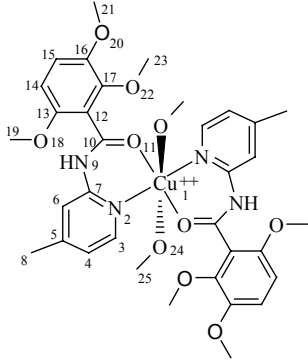
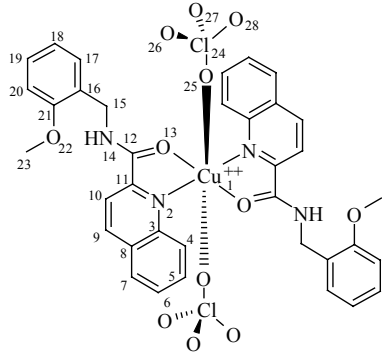


Figure 3.4. Superposition des structures de C1 et C2 obtenues par DRX (en gris) et par optimisation par SIBFA (en noir). Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

Au niveau des angles dièdres, les écarts les plus importants sont observés au niveau des groupements méthoxyphényles présents sur chaque ligand. Les déviations peuvent aller jusqu'à 34.0°. Afin de valider les valeurs d'angles obtenues par modélisation, une analyse statistique dans CSD a été entreprise. Pour obtenir un nombre significatif de structures, nous avons travaillé en trois étapes.

Dans un premier temps, l'angle dièdre caractérisant un groupement méthoxy substituant un cycle benzénique a été étudié. Nous avons considéré qu'aucun groupement susceptible de générer un encombrement stérique n'était présent en *ortho* du méthoxy. La distribution obtenue (Figure 3.5.a.) montre que la structure générale de ce type de fragment est plane.

Tableau 3.3.: Comparaison de certains paramètres géométriques caractéristiques des complexes **C1** et **C2** (distances [Å], angles de valence [°] et angles dièdres [°]) obtenus après minimisation par la méthode SIBFA, avec ceux observés à l'état cristallin. Les esd sont repris entre parenthèses. Le symbole # pointe les valeurs angulaires cristallographiques obtenues par opération de symétrie.

		DRX	SIBFA
C1			
	O ₁₁ -Cu ₁	1.955(1)	1.91 1.90
	N ₂ -Cu	2.011(2)	2.14 2.15
	Cu ₁ -O ₂₄	2.423(2)	2.09 2.14
	O ₁₁ -Cu ₁ -N ₂	89.17(6)	85.72 85.94
	O ₁₁ -Cu ₁ -N ₂ #	90.83(6)	93.70 94.69
	O ₁₁ -Cu ₁ -O ₂₄	90.11(8)	94.51 95.08
	N ₂ -Cu ₁ -O ₂₄	86.56(8)	90.82 92.19
	C ₂₁ -O ₂₀ -C ₁₆ -C ₁₅	7.6(4) -7.6(4)#	26.78 -28.58
	C ₂₃ -O ₂₂ -C ₁₇ -C ₁₆	76.3(3) -76.3(3)#	56.63 -62.15
	C ₁₉ -O ₁₈ -C ₁₃ -C ₁₄	17.4(2) -17.4(2)#	32.05 -30.56
	O ₁₁ -C ₁₀ -C ₁₂ -C ₁₃	117.0(2) -117.0(2)#	129.77 -131.16
	C ₁₀ -N ₉ -C ₇ -C ₆	-164.7(2) 164.7(2)#	-174.09 172.65
C2			
	O ₁₃ -Cu ₁	1.924(2)	1.92 1.93
	N ₂ -Cu ₁	2.097(2)	2.26 2.22
	Cu ₁ -O ₂₅	2.464(8)	2.21 2.20
	O ₁₃ -Cu ₁ -N ₂	80.85(7)	79.67 79.97
	O ₁₃ -Cu ₁ -N ₂ #	99.15(7)	101.70 98.74
	O ₁₃ -Cu ₁ -O ₂₅	78.01(8)	91.23 87.48
	N ₂ -Cu ₁ -O ₂₅	94.06(8)	92.39 97.80
	C ₂₀ -C ₂₁ -O ₂₂ -C ₂₃	0.4(5) -0.4(5)#	-3.36 33.06
	N ₁₄ -C ₁₅ -C ₁₆ -C ₁₇	87.3(3) -87.3(3)#	87.70 -87.99
	C ₁₀ -C ₁₁ -C ₁₂ -N ₁₄	2.5(3) -2.5(3)#	21.17 -16.71
	C ₁₂ -N ₁₄ -C ₁₅ -C ₁₆	-95.8(3) 95.8(3)#	-101.78 103.98

Ensuite, nous avons étudié l'influence de la présence d'une amide en *ortho* du méthoxy, en imposant que cette amide s'oriente de manière à permettre un pont H intramoléculaire. Dans ce cas, nous mimons l'angle C₁₉-O₁₈-C₁₃-C₁₄ de **C1** et l'angle C₂₀-C₂₁-O₂₂-C₂₃ de **C2**. Ici aussi, la distribution montre que le méthoxy reste dans le plan du noyau aromatique (Figure 3.5.b.) : les valeurs d'angle sont toutes proches de 0° excluant les valeurs de 180°. On voit ici que l'amide n'influence pas outre mesure la géométrie d'un méthoxyphényle. Dans le cas de **C1**, l'angle observé en cristallographie (±17.4°) s'écarte un peu de la distribution. La différence est cependant bien plus

grande pour les valeurs obtenues par la méthode SIBFA (32.05 et -30.56°). En ce qui concerne **C2**, les études de DRX donnent une valeur de $\pm 0.4^\circ$, tandis qu'un seul des deux angles résultant de l'optimisation par SIBFA est proche de 0° (-3.36°), l'autre atteignant une valeur de 33.06° .

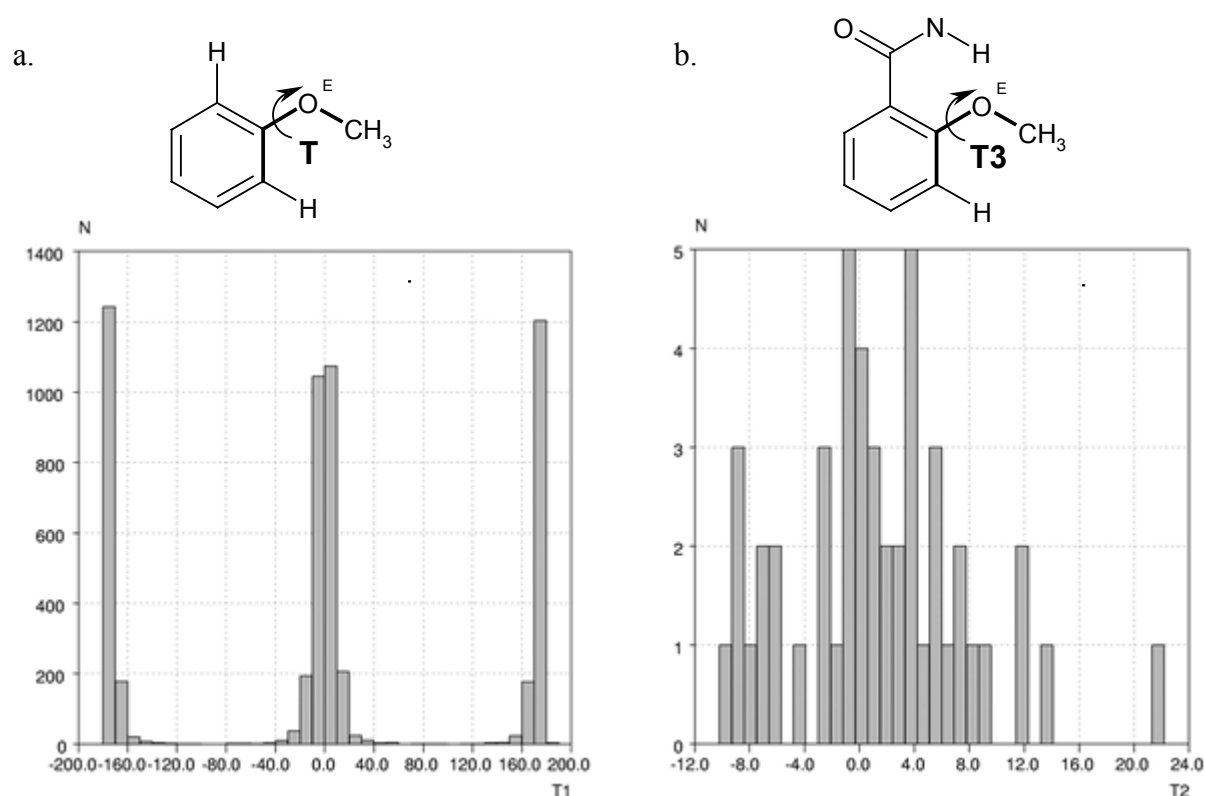


Figure 3.5. Fragments de recherche et distributions correspondantes des angles dièdres (en gras) caractérisant le groupement méthoxyphényle. a. non substitué (nombre de composés : 5498). b. substitué par un groupement amide en *ortho* du méthoxy (nombre de composés : 48).

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux angles $\text{C}_{21}\text{-O}_{20}\text{-C}_{16}\text{-C}_{15}$ (T_1) et $\text{C}_{23}\text{-O}_{22}\text{-C}_{17}\text{-C}_{16}$ (T_2) du complexe **C1**. Sur le fragment de recherche, nous avons gardé les deux groupements méthoxy. L'environnement immédiat de T_1 est donc semblable à ce qu'on observe au sein de **C1**, avec une seule substitution en *ortho*. Comme nous avons vu que la fonction amide n'avait pas d'influence directe sur la géométrie du méthoxy, nous avons postulé qu'un encombrement stérique dans les deux positions *ortho* par rapport à l'angle T_2 pouvait expliquer la déviation au plan observée en cristallographie et par SIBFA. Nous avons donc considéré que l'angle T_2 était encadré par deux groupements substituant le noyau aromatique, avec, d'un côté, le premier méthoxy et, de l'autre, n'importe quelle fonction chimique. En pratique, nous avons défini un pseudo-atome, X, pouvant être soit un carbone, soit un oxygène, soit un azote, soit un soufre.

Les distributions que nous avons obtenues, présentées à la figure 3.6. selon la répartition des angles T1 en fonction de T2, confirment cette idée. Ainsi la distribution correspondant à l'angle T1 est centrée sur 0° et s'étend sur un intervalle de $\pm 40^\circ$. Les valeurs observées en cristallographie ($\pm 7.6^\circ$) et par SIBFA (26.78° et -28.58°) coïncident avec cette distribution, même si elles s'écartent un peu du centre de celle-ci. Dans le cas de T2, deux distributions sont centrées sur $\pm 80^\circ$ et s'étendent de $\pm 40^\circ$ à $\pm 120^\circ$. Les résultats de DRX ($\pm 76.3^\circ$) sont bien en accord avec ces valeurs statistiques. De même, les angles obtenus par la méthode SIBFA ne s'éloignent pas trop du centre de ces distributions (56.63° et -62.15°) comme on peut le voir à la figure 3.6. On peut donc dire que la modélisation par la méthode SIBFA de ces deux angles dièdres donne des résultats relativement bons.

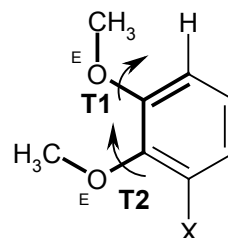
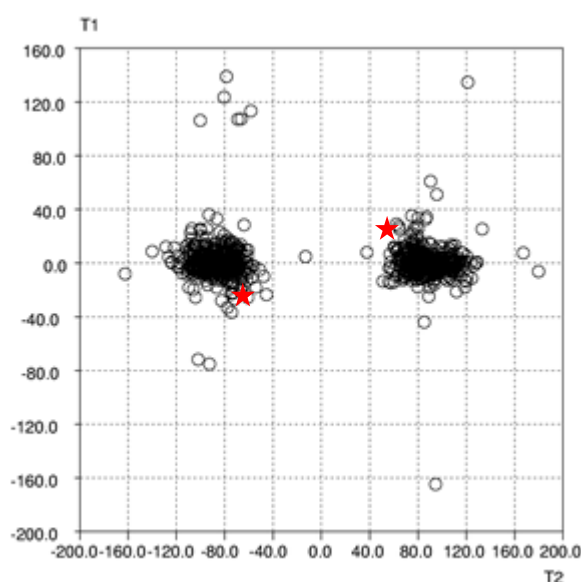


Figure 3.6. Fragment de recherche et distribution statistique des angles dièdres T1 en fonction de T2 (en gras). Les valeurs obtenues suite à l'optimisation par la méthode SIBFA (étoiles rouges) ne s'éloignent pas trop du centre de ces distributions (nombre de composés : 778).

3.2. Les propriétés énergétiques des complexes C1, C2 et de leurs dérivés

... l'étude de la stabilité relative de C1 et C2 en présence d'acétate

La prédiction de propriétés énergétiques caractérisant les complexes métalliques, telles que leur stabilité thermodynamique, peut s'avérer extrêmement utile lorsque l'on ne dispose pas de données expérimentales directes. Dans le processus de conception de médicament que nous menons, il est indispensable de prendre en compte cette propriété si on souhaite proposer de nouvelles molécules potentiellement plus actives.

Dans cette optique, nous avons, après leur optimisation en solution aqueuse par la méthode SIBFA, modélisé la stabilité des complexes **C1** et **C2**. Nous avons considéré dans ces conditions que de l'eau occupait les positions apicales des complexes. L'énergie de stabilisation ΔE_{stab} a été évaluée en tenant compte des phénomènes de solvation et de réorganisation des ligands intervenant lors de la complexation, selon l'équation suivante:

$$\Delta E_{\text{stab}} = E_{\text{C}} + E_{\text{solvC}} - 2 (E_{\text{L}} + E_{\text{solvL}}) - 2 E_{\text{solvH}_2\text{O}} - E_{\text{solvCu}}$$

avec C et L, correspondant respectivement au complexe et au ligand optimisé. Le symbole E_{solv} reprend ici la contribution due à la solvation des différentes espèces.

Nous avons vu que la stabilité de **C1** et **C2** dépendait de la présence de ligands compétitifs comme l'acétate dans le milieu étudié. Dès lors, nous avons évalué, en parallèle, la stabilité de l'acétate de cuivre (II). A l'image de la structure reprise à la figure 3.1., l'acétate de cuivre présente, à l'état solide, une structure dimérique binucléaire. En effet, deux atomes de cuivre, liés entre eux, se partagent quatre ions acétates. Les coordinations restantes en positions apicales sont occupées par deux molécules d'eau. Ce couplage confère au complexe des propriétés antiferromagnétiques typiques⁷²⁵. En solution aqueuse, on observe cependant la dissociation du dimère conduisant à la forme mononucléaire du complexe⁷²⁶⁻⁷²⁹. Des études en infrarouge ont montré que deux acétates monodentates complexent l'ion cuivrique central. On observe, en outre, des ponts hydrogène intramoléculaires entre les atomes d'oxygène non impliqués dans la complexation et les molécules d'eau assurant le reste de la coordination⁷³⁰. Nous avons donc considéré dans nos calculs que l'acétate de cuivre se présentait sous cette forme, en ajoutant quatre molécules d'eau pour compléter une coordination octaédrique.

L'acétate de cuivre (II), en solution aqueuse, est caractérisé par une constante de stabilité assez faible⁷³¹:

$$\begin{aligned}K_1 &= [\text{ML}]/[\text{M}].[L] = 49.0 \\K_2 &= [\text{ML}_2]/[\text{ML}].[L] = 10.7 \\ \beta_2 &= [\text{ML}_2]/[\text{M}].[L]^2 = 525\end{aligned}$$

Une simulation de la distribution des espèces présentes en solution en fonction du pH a été réalisée à l'aide du programme SPECIES.EXE implémenté dans la banque de données SC-database⁷³² reprenant les constantes de stabilité d'un grand nombre de complexes métallo-organiques. A pH 5.5, l'espèce majoritaire est l'ion cuivrique libre. Cependant, on retrouve environ 10% de monoacétate de cuivre $[\text{Cu}(\text{OAc})]^+$. Notons, qu'à ce pH, seules des traces du diacétate, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, subsistent. Bien qu'il soit impossible de prendre en compte le pH du milieu lors des calculs de stabilité par la méthode SIBFA, nous avons décidé, sur base de ces informations et à titre indicatif, d'intégrer dans notre étude le monoacétate de cuivre, en ajoutant cinq molécules d'eau pour occuper les coordinations restantes (Figure 3.7.a.).

Similairement à la méthodologie adoptée pour **C1** et **C2**, la stabilité des acétates de cuivre a été évaluée comme suit:

$$\Delta E_{\text{stab}} = E_{\text{C}} + E_{\text{solvC}} - x (E_{\text{OAc}} + E_{\text{solvOAc}}) - y E_{\text{solvH}_2\text{O}} - E_{\text{solvCu}}$$

avec x et y correspondant respectivement au nombre d'ions acétate et de molécules d'eau dans le complexe.

Le tableau 3.4. reprend les stabilités relatives de **C1**, **C2** et des acétates de cuivre (II). Dans le cas de $\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})_4$, deux types de complexation ont été envisagés (Figures 3.7.b. et c.). Dans le premier cas, un des acétates n'est pas directement lié au cuivre, mais exerce son influence en formant trois ponts hydrogène avec trois molécules d'eau coordonnées ; le complexe est ainsi caractérisé par un nombre de coordination de cinq (CN=5). Dans le second cas, le complexe est plus classiquement octaédrique (CN=6), les deux acétates et les quatre molécules d'eau étant directement liées au cuivre. Après minimisation, on observe bien, pour les trois complexes d'acétate de cuivre, qu'une coordination monodentate permet la formation de ponts hydrogène avec les molécules d'eau assurant le reste de la coordination, en accord avec les données d'infrarouge⁷³⁰.

Tableau 3.4. Energies d'interaction (kcal/mol) de **C1**, **C2** et des complexes d'acétate de cuivre après le processus de minimisation avec SIBFA. Les valeurs d' E_{solvCu} et de $E_{\text{solvH}_2\text{O}}$, permettant de calculer le ΔE_{stab} , sont respectivement de -539.2 et de -3.9 kcal/mol. Les différentes contributions à l'énergie d'interaction intermoléculaire ont été obtenues en soustrayant à l'énergie des complexes deux fois celle de leur ligand respectif.

Complexes	C1	C2	[CuOAc(H₂O)₅]⁺	Cu(OAc)₂(H₂O)₄	
				CN=5	CN=6
E_{MTP}	-397.3	-353.7	-544.4	-648.7	-665.4
E_{rep}	120.2	105.5	104.1	122.9	108.9
E_{pol}	-126.2	-129.1	-75.7	-93.7	-70.4
E_{ct}	-11.6	-10.4	-15.6	-22.0	-14.4
E_{disp}	-46.3	-45.1	-34.8	-36.4	-38.7
ΔE_{int}	-460.5	-432.5	-566.4	-677.8	-679.9
E_{tor}	-11.3	2.9	0.0	0.0	0.0
E_{solv}	-110.3	-127.2	4.6	107.9	110.5
ΔE_{stab}	-34.9	-9.8	-3.0	-14.9	-14.5

Ces résultats montrent clairement que **C1** est plus stable que **C2** avec une différence de plus de 25 kcal/mol en faveur de **C1**^{*}. Les complexes de diacétate de cuivre font preuve d'une stabilité accrue par rapport au monoacétate. Ce comportement concorde avec les constantes de stabilité citées plus haut : l'ajout d'un second ligand augmente en effet d'un facteur 10 la valeur de la constante de stabilité globale β_2 . Par contre, les deux types de complexation envisagés pour le diacétate sont énergétiquement très proches (0.4 kcal/mol en faveur du complexe pentacoordiné).

Il est intéressant de comparer les stabilités de **C1** et de **C2** à celle du diacétate de cuivre. Elles éclairent, en effet, les conclusions que nous avons tirées suite aux travaux de RPE : dans un tampon acétate à pH 5.5, **C1** et **C2** subissent un phénomène de décomplexation, partielle pour le premier, et totale pour le second. Les énergies obtenues par la méthode SIBFA nous montrent que **C1** est plus stable que l'acétate de cuivre (d'environ 20 kcal/mol) ; il restera donc, au moins partiellement, sous forme de complexe en solution. Par contre, l'énergie de stabilisation de **C2** est environ 5 kcal/mol plus élevée que celle de l'acétate de cuivre. Dans ces conditions, on s'attend bien à ce que **C2** soit tout à fait dissocié. Nous devons néanmoins garder une certaine prudence dans cette interprétation. En effet, certains facteurs extérieurs, comme par exemple le pH du milieu, peuvent déterminer la distribution des différentes espèces en solution, mais ne sont pas pris en compte dans les études de modélisation.

^{*} Cette différence est peut-être surestimée car nous travaillons sur des modèles simplifiés dans lesquels on ne tient pas compte, par exemple, de la présence de contre-ions.

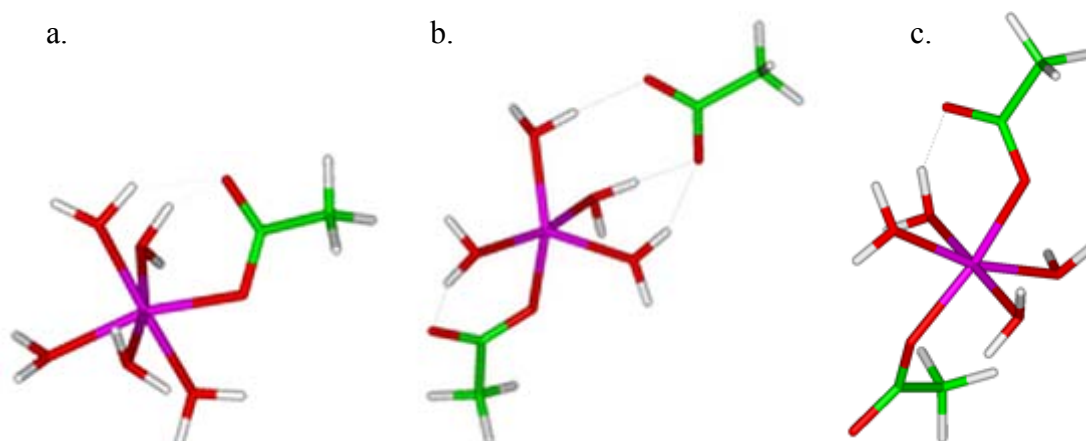


Figure 3.7. Structures de différents complexes d'acétate de cuivre (II) obtenues après minimisation avec SIBFA. a. $[\text{CuOAc}(\text{H}_2\text{O})_5]^+$. b. $\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})_4$, CN=5. c. $\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})_4$, CN=6.

... l'influence de la structure des ligands sur la stabilité des complexes

Nous avons vu, dans les conclusions du chapitre précédent, que divers facteurs structuraux pouvaient influencer la stabilité des complexes. Parmi eux, on retrouve la taille des cycles chélates formés avec l'ion métallique central et les propriétés stéréoélectroniques des ligands. Afin de comprendre l'origine de la stabilité accrue de **C1** par rapport à **C2**, nous nous sommes intéressés, d'une part, aux dérivés tronqués de ces complexes et, d'autre part, à l'influence de leurs substituants méthoxy sur leur stabilité.

Les complexes tronqués **C1a-bis** et **C2a-bis** ont été construits à partir des ligands **L1a** et **L2a** représentés à la figure 3.2. Ces ligands adoptent une conformation *cis*, ce qui leur permet de chélater l'ion cuivrique central suivant un mode bidentate. En positions apicales, on retrouve deux molécules d'eau. La conformation *trans* n'a pas été envisagée ici car elle ne peut être stabilisée, ni par pont H intramoléculaire, ni par l'intervention dans la complexation d'un deuxième atome coordonnant de la molécule apicale.

Comme nous le précisons dans le point précédent, les ligands **L1a** et **L2a** sont constitués à partir de fragments identiques. Dans la succession des jonctions, l'inversion de la molécule de formamide conduit à la formation de cycles chélates de

tailles différentes: un cycle à six membres, dans le cas de **C1a-bis** et un cycle à cinq membres dans le cas de **C2a-bis** (Figure 3.8.).

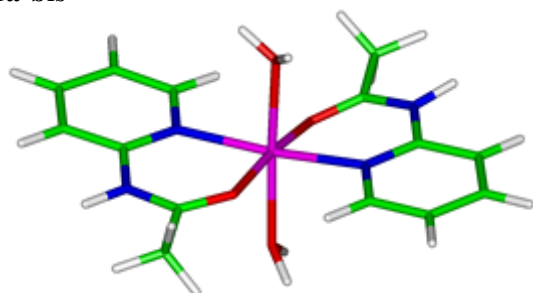
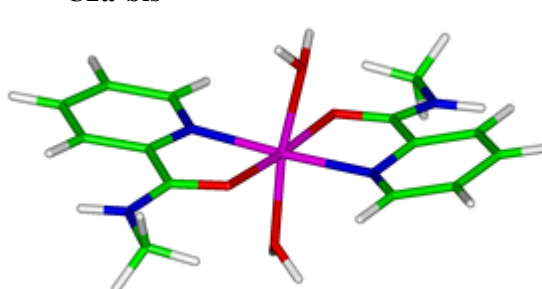
C1a-bis**C2a-bis**

Figure 3.8. Structure des complexes **C1a-bis** et **C2a-bis** obtenus suite au processus de minimisation par SIBFA.

Si un cycle à cinq est généralement plus favorable qu'un cycle à six membres, il faut noter que le cycle chélate de **C1a-bis** pourrait présenter un certain caractère aromatique stabilisant. Afin de déterminer l'influence du cycle chélate, un processus de minimisation a été entrepris dans l'eau, débouchant sur les énergies reprises dans le tableau 3.5. L'énergie de stabilisation ΔE_{stab} des deux complexes tronqués a été évaluée de la même manière que celle de **C1** et **C2**.

Tableau 3.5. Comparaison des énergies d'interaction (kcal/mol) de **C1** et **C2** avec celles de leurs dérivés tronqués **C1a-bis** et **C2a-bis**, obtenues après minimisation avec SIBFA. Les différentes contributions à l'énergie d'interaction intermoléculaire ont été obtenues en soustrayant à l'énergie des complexes deux fois celle de leur ligand respectif. Les valeurs d' E_{solvCu} et de $E_{\text{solvH}_2\text{O}}$, permettant de calculer le ΔE_{stab} , sont respectivement de -539.2 et de -3.9 kcal/mol.

Complexes	C1	C2	C1a-bis	C2a-bis
E_{MTP}	-397.3	-353.7	-334.1	-349.9
E_{rep}	120.2	105.5	105.2	102.5
E_{pol}	-126.2	-129.1	-106.8	-98.9
E_{ct}	-11.6	-10.4	-10.7	-10.8
E_{disp}	-46.3	-45.1	-39.4	-37.8
ΔE_{int}	-460.5	-432.5	-385.8	-394.8
E_{tor}	-11.3	2.9	-3.8	1.0
E_{solv}	-110.3	-127.2	-136.6	-140.8
ΔE_{stab}	-34.9	-9.8	20.6	12.7

Plusieurs constatations s'imposent d'emblée : si on compare les complexes tronqués entre eux, il apparaît que **C2a-bis** est plus stable que **C1a-bis**. La différence de 8 kcal/mol entre les énergies de stabilisation n'est pas négligeable : on peut donc en déduire que la formation d'un cycle chélate à cinq membres paraît plus favorable. Notons cependant que les deux dérivés tronqués ont des énergies de stabilisation positives bien plus élevées que celles des complexes **C1** et **C2** dont ils découlent. Leur existence en tant que complexe semble, dès lors, peu probable, mais rappelons qu'il s'agit moins ici d'étudier la possibilité de former de tels composés que de mettre en évidence des éléments structuraux favorisant la stabilité des complexes qui font l'objet de cette thèse.

En outre, on observe que la suppression du groupement triméthoxyphényle de **C1**^{*} conduit à une perte d'énergie de stabilisation de plus de 55 kcal/mol, alors que celle du groupement méthoxybenzyle et du deuxième cycle aromatique de la quinoléine de **C2** déstabilise le complexe de 22.5 kcal/mol^{**}. Le triméthoxyphényle semble, dès lors, jouer un rôle clé dans la stabilisation de **C1**, d'autant plus qu'il est directement branché sur le site de chélation. Son effet électrodonneur pourrait renforcer la densité électronique au niveau des atomes coordinants, ce qui favoriserait la formation d'une liaison plus stable avec l'ion cuivrique.

Nous avons étudié plus en détail l'influence de chaque groupement méthoxy sur la stabilité de **C1**. Les méthoxys positionnés en *ortho* et/ou en *meta* du cycle phénylique ont été successivement supprimés, donnant naissance aux ligands **L1b-g** repris à la figure 3.9. Les complexes **C1b-g** ont été formés à partir des ligands correspondants, avec des molécules d'eau en positions apicales. Parallèlement, nous avons également étudié l'influence du seul groupement méthoxy présent sur **L2**. Remarquons que sa suppression conduit en fait au ligand **L3**.

Similairement à ce qui avait été entrepris pour les dérivés tronqués, chaque complexe a été soumis à une minimisation dans l'eau par la méthode SIBFA. Les énergies résultant de ces calculs sont reprises dans le tableau 3.6, tandis qu'une comparaison entre les différentes énergies de stabilisation peut être visualisée à la figure 3.10.

Par rapport au dérivé tronqué **C1a-bis**, l'apport du cycle phényle substituant l'amide à la stabilité du complexe **C1** est indéniable. On voit, en effet, une stabilisation de plus de 40 kcal/mol en faveur du complexe **C1b**. Lorsque ce cycle phényle est substitué en position *ortho* par des groupements méthoxy (complexes **C1d-g**), cette

^{*} Et sans doute dans une moindre mesure celle du méthyle localisé en *para* de la pyridine.

^{**} Ces différences sont sans doute surestimées mais nous permettent de constater certaines tendances.

stabilisation est encore accrue. Le méthoxy positionné en *meta* semble avoir moins d'influence sur la stabilité du complexe et est même parfois plutôt défavorable, comme dans le cas de **C1c**.

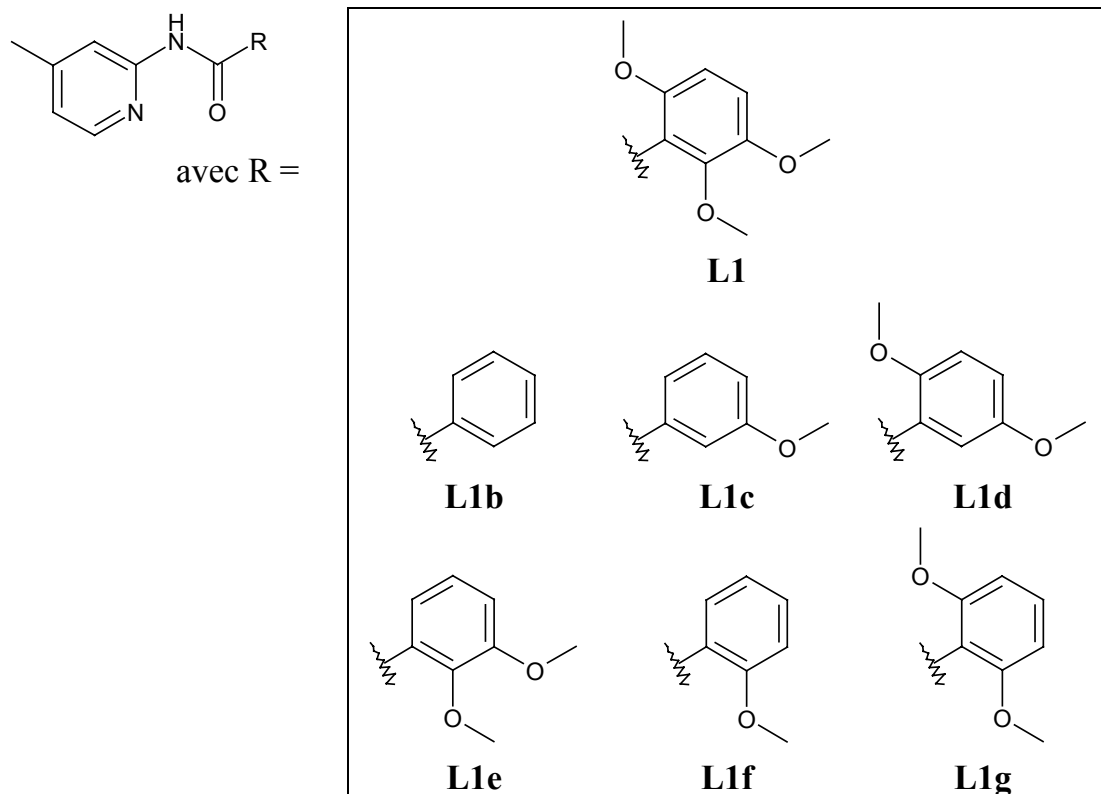


Figure 3.9. Structure des ligands **L1b-g** obtenus suite à la suppression systématique des méthoxys substituant en *ortho* et/ou *meta* le cycle phénylique.

En effet, si on compare entre eux les ΔE_{stab} de **C1** avec ceux de **C1c**, **C1d** et **C1e**, dans le cas où on a supprimé successivement les deux *ortho*-méthoxys à la fois, et puis un par un, on constate que chacun d'eux contribuent à une stabilisation d'environ 6 kcal/mol. De même, lorsque l'on passe du cycle phénylique non substitué dans **C1b** à l'*ortho* méthoxyphényle de **C1f**, on observe un gain de 6 kcal/mol. Une stabilisation supplémentaire de 3 kcal découle de l'ajout d'un deuxième méthoxy en position *ortho* dans le complexe **C1g**. Si on effectue la comparaison par rapport à **C1**, la suppression du *meta*-méthoxy dans **C1g** n'induit qu'une déstabilisation de 2 kcal/mol. Par contre, le complexe **C1c** nous montre que l'ajout de ce *meta*-méthoxy sur le cycle phényle non substitué dans **C1b** provoque une perte de 2 kcal/mol à l'énergie de stabilisation.

L'analyse des différentes contributions au ΔE_{stab} (Tableau 3.6.), nous permet de voir que ces résultats découlent principalement des termes électrostatiques et répulsifs. En effet, la contribution répulsive E_{rep} pâtit de la présence de chaque groupement méthoxy. Le dérivé benzamide **C1b**, dont le cycle phényle n'est pas substitué, est le plus favorable sur le plan répulsif. Ainsi, l'ajout d'un méthoxy en *meta* (**C1c**) ou en *ortho* (**C1f**) se traduit par une augmentation de E_{rep} de respectivement 3 et 10 kcal/mol.

Tableau 3.6. Comparaison des énergies d'interaction (kcal/mol) de **C1** et **C2** (colonnes en grisé) avec celles de leurs dérivés sans méthoxy **C1b-g** et **C3**, obtenues après minimisation avec SIBFA. Les différentes contributions à l'énergie d'interaction intermoléculaire ont été obtenues en soustrayant à l'énergie des complexes deux fois celle de leur ligand respectif. Les valeurs d' E_{solvCu} et de $E_{\text{solvH}_2\text{O}}$, permettant de calculer le ΔE_{stab} , sont respectivement de -539.2 et de -3.9 kcal/mol.

Cplx.	C1	C1b	C1c	C1d	C1e	C1f	C1g	C2	C3
E_{MTP}	-397.3	-363.1	-363.6	-370.3	-390.1	-375.2	-393.3	-353.7	-333.2
E_{rep}	120.2	100.3	103.2	104.9	116.3	110.7	112.7	105.5	97.1
E_{pol}	-126.2	-122.5	-125.6	-128.6	-122.1	-128.4	-127.2	-129.1	-127.8
E_{ct}	-11.6	-11.2	-11.5	-11.2	-11.7	-11.3	-11.5	-10.4	-10.5
E_{disp}	-46.3	-40.3	-41.9	-41.4	-45.7	-42.1	-44.6	-45.1	-43.2
ΔE_{int}	-460.5	-436.4	-438.9	-446.1	-453.0	-445.8	-463.1	-432.5	-417.3
E_{tor}	-11.3	-2.0	-2.8	-5.4	-6.3	-7.1	-6.2	2.9	3.7
E_{solv}	-110.3	-132.5	-133.3	-124.8	-115.3	-124.4	-110.5	-127.2	-131.2
ΔE_{stab}	-34.9	-23.8	-22.4	-29.1	-28.4	-30.3	-32.8	-9.8	2.0
E_{MTP^*}	-142.4	-127.7	-130.3	-131.7	-139.2	-132.9	-142.2	-116.3	-111.4

* E_{MTP} évaluée en considérant une charge +1 sur le cuivre et sans prendre en compte les molécules d'eau apicales.

L'évolution de la contribution électrostatique E_{MTP} est, à l'opposé, favorisée par la présence de chacun des trois substituants méthoxys. Cette stabilisation provient principalement des dérivés *ortho*. Notons que les termes électrostatiques de **C1e** et **C1d** qui possèdent tous deux un méthoxy en *ortho* et un méthoxy en *meta*, sont fort différents. Lorsque ces deux méthoxys sont adjacents au sein de **C1e**, le terme électrostatique est stabilisé de 20 kcal/mol par rapport à **C1d**. En tenant compte de toutes les contributions, les ΔE_{stab} de **C1d** et **C1e** se rééquilibrent pour atteindre des valeurs similaires.

La suppression du groupement méthoxy substituant en position *ortho* les cycles benzyles de **C2** conduit au complexe **C3** et provoque également une déstabilisation du d'environ 12 kcal/mol. On obtient alors une valeur d'énergie de stabilisation positive, témoignant de la difficulté de former un complexe stable. Rappelons, en effet, qu'il n'a pas été possible de cristalliser le complexe **C3**, et qu'en spectrométrie de masse,

l'espèce majoritaire en solution correspond de loin au ligand libre. Bien que nous ne connaissions pas les valeurs des constantes de stabilité de **C2** et **C3**, les données expérimentales semblent donc indiquer une stabilité plus faible de **C3** par rapport à **C2**, en accord avec les résultats que nous avons obtenus par SIBFA.

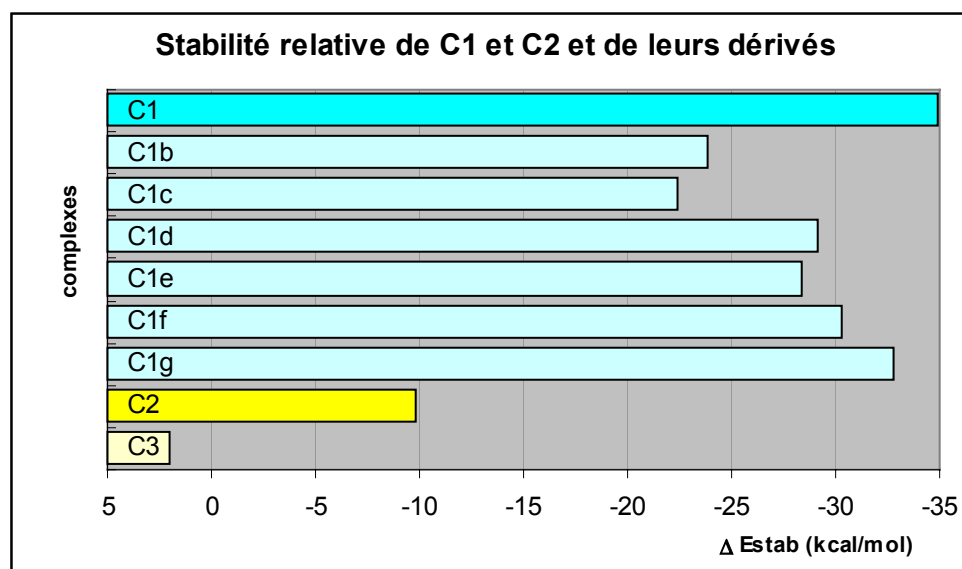


Figure 3.10. Stabilités relatives de **C1**, **C2** et de leurs dérivés. Les substituants méthoxyphényles ont un effet stabilisateur aussi bien sur le complexe **C1** (en bleu), que sur le complexe **C2** (en jaune).

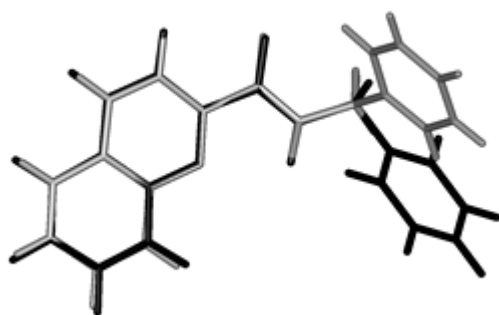


Figure 3.11. Superposition des structures de **L3** obtenues par DRX (en gris) et après minimisation par SIBFA (en noir).

A titre indicatif, comme nous possédons la structure cristallographique du ligand **L3**, nous l'avons comparée à celle obtenue à l'issue du processus de minimisation par SIBFA. Comme on peut le voir à la figure 3.11., la superposition des deux structures est adéquate sauf au niveau de la partie méthoxybenzyle, plus flexible. On retrouve évidemment les atomes d'azote et d'oxygène donneurs en position *trans* l'un par rapport à l'autre.

Nous avons vu qu'une contribution importante à l'énergie de stabilisation provenait du terme électrostatique. Dès lors, il nous a semblé intéressant de comparer ce terme aux potentiels électrostatiques moléculaires (PEM) obtenus par mécanique quantique. Nous avons travaillé à partir

des structures cristallographiques des complexes **C1** et **C2**, en supprimant si nécessaire les différents groupements méthoxys. L'évaluation *ab initio* des PEM a été réalisée suivant la méthode HF/6-31g*, en supprimant l'ion cuivrique et les molécules se trouvant en positions apicales. La figure 3.12. reprend les différents puits de potentiels obtenus à l'emplacement du centre métallique.

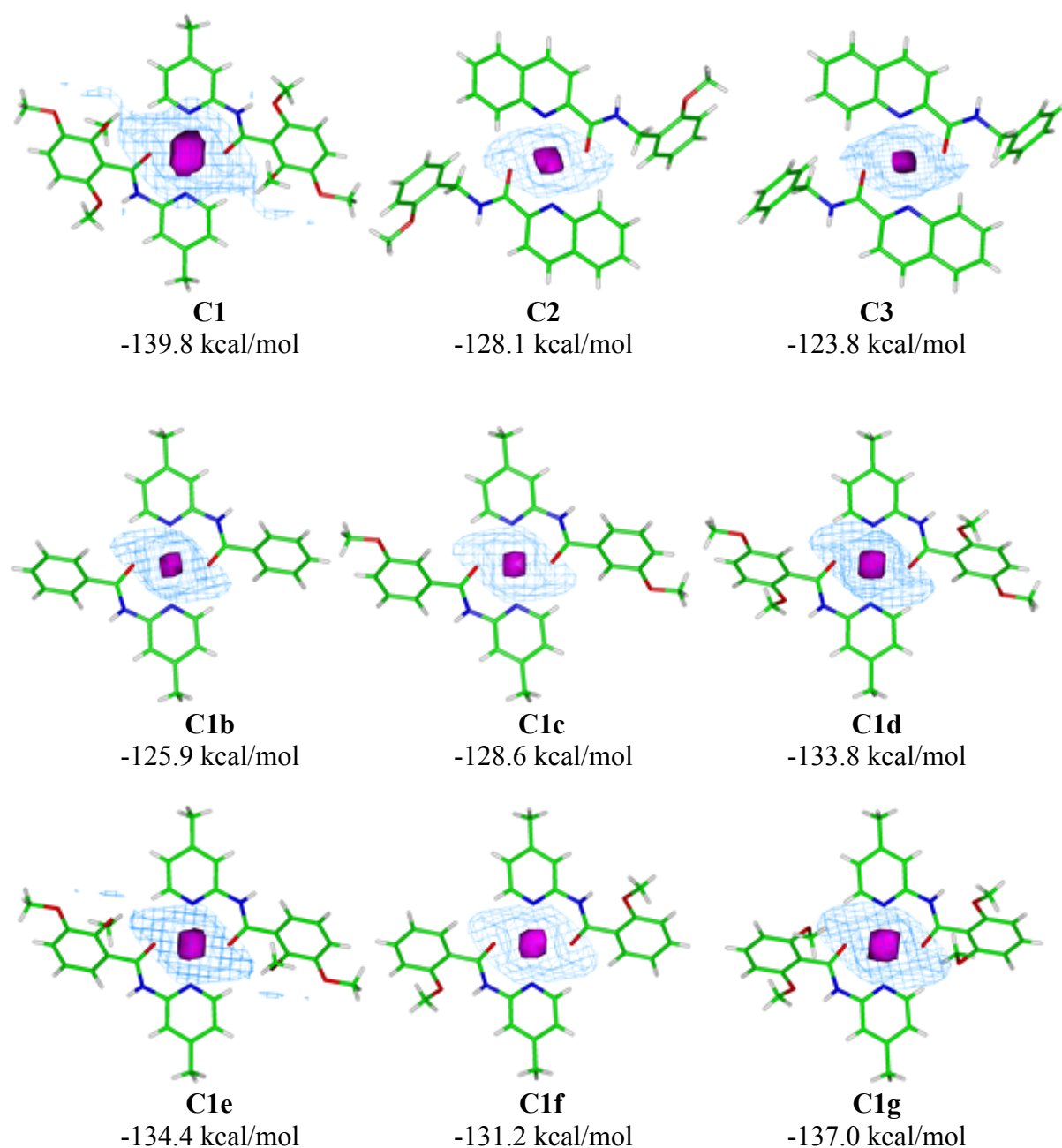


Figure 3.12. Représentation des potentiels électrostatiques moléculaires calculés suivant la méthode HF/6-31g* sur les structures cristallographiques de **C1**, de **C2**, et de leurs dérivés. Le calcul des PEM a été effectué suite à la suppression de l'ion cuivrique central et des molécules apicales. Les isosurfaces sont reprises à -120 kcal/mol, en fuchsia, et à -50 kcal/mol en bleu. La valeur du puits de potentiel localisé à l'emplacement du centre métallique est mentionnée en dessous de chaque structure.

D'autre part, nous avons réévalué la valeur du terme électrostatique E_{MTP^*} en supprimant également les molécules apicales et en considérant une charge +1 sur l'atome de cuivre. En effet, un PEM, dont la définition est reprise à la page 108 du chapitre 'Matériel et Méthodes', représente l'interaction en un point de l'espace, dans notre cas au niveau du cuivre, d'une charge positive unitaire avec le reste de son environnement moléculaire. Les valeurs de E_{MTP^*} résultant de ces calculs sont reprises à la dernière ligne du tableau 3.6. La comparaison entre ces valeurs et celles des énergies correspondant aux puits de potentiels obtenus par calcul *ab initio* se trouve à la figure 3.13.

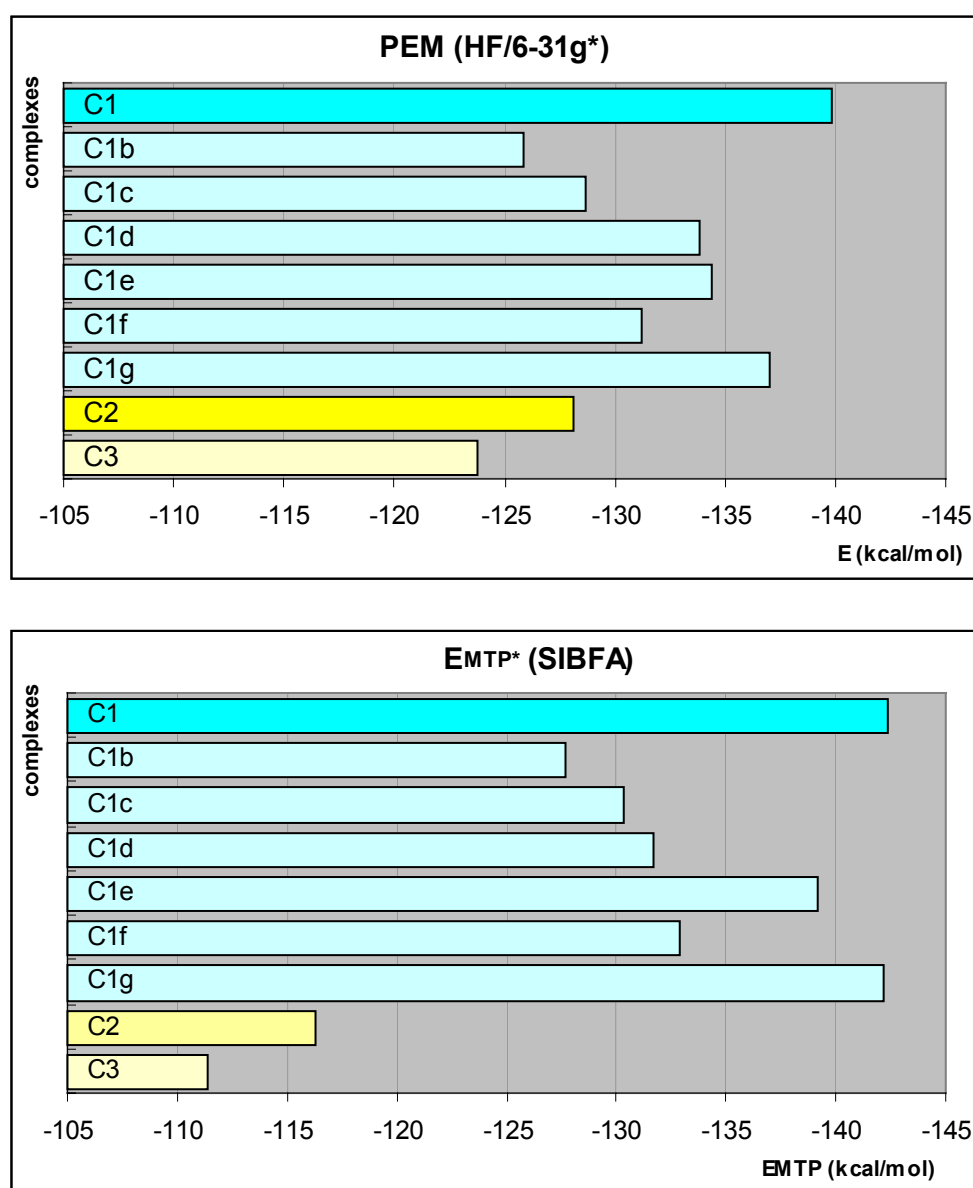


Figure 3.13.: Comparaison entre les valeurs des puits de potentiels localisés au niveau de l'ion cuivrique et les contributions électrostatiques E_{MTP^*} correspondantes évaluées par SIBFA.

On peut voir une corrélation entre la contribution électrostatique de SIBFA et le PEM rencontré à l'emplacement de l'ion cuivrique central. Les énergies sont relativement proches les unes des autres, surtout pour les dérivés de **C1**, avec dans le meilleur des cas, pour **C1f**, une différence de 1.7 kcal/mol (1.3% d'erreur) entre les valeurs de E_{MTP^*} et de PEM, et dans le cas le moins favorable, pour **C1g**, de 5.2 kcal/mol (3.8 % d'erreur).

Les valeurs de E_{MTP^*} obtenues pour **C2** et **C3** s'éloignent plus de celles de leur puits de potentiel respectifs. Néanmoins, on peut constater que la suppression du substituant *ortho*-méthoxy conduit à une déstabilisation semblable des deux termes d'environ 4 kcal/mol.

Lorsque l'on compare les PEM des dérivés de **C1**, on remarque également que les trois méthoxys contribuent à la stabilisation du complexe, avec une prédominance des substituants localisés en position *ortho*. En effet, chaque *ortho*-méthoxy apporte une stabilisation d'environ 6 kcal/mol, tandis que la contribution du *meta*-méthoxy n'est que de 3 kcal/mol. Les valeurs de E_{MTP^*} obtenues par SIBFA reflètent également bien ces tendances.

3.3. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté notre contribution au développement de la méthode SIBFA. En effet, la procédure a été élargie pour inclure dans son champ d'investigation les systèmes comprenant du cuivre (II)^{*}, tels que les complexes que nous étudions dans le cadre de cette thèse. L'incorporation au sein de la méthode SIBFA de paramètres permettant la description de l'ion cuivrique et son interaction avec différents ligands a donc permis d'étudier en détail les phénomènes énergétiques impliqués dans la stabilisation des complexes **C1**, **C2** et de leurs dérivés. Outre cette application directe, que nous avons présentée dans ce chapitre, il est intéressant de disposer d'un champ de force polarisable adapté au cuivre (II). En effet, le cuivre est un métal incontournable en chimie bio-inorganique, comme nous l'avons expliqué dans la dernière partie de l'introduction générale. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions enzymatiques et fait partie intégrante de protéines aussi importantes que la superoxyde dismutase ou le cytochrome-c oxydase. A court terme, il serait, dès lors, intéressant de modéliser au moyen de la méthode SIBFA le complexe **C1** en interaction avec la protéase.

Si l'utilisation de SIBFA dans l'étude de systèmes macromoléculaires possédant des centres métalliques est parfaitement indiquée et a déjà porté ses fruits⁶⁴²⁻⁶⁴⁶, elle nous a, quant à nous, permis d'étudier en détail les phénomènes énergétiques intervenant dans la stabilité des complexes au cuivre(II). Les résultats que nous avons obtenus ont été recoupés par les données expérimentales acquises précédemment. En accord avec ces dernières, SIBFA permet de prévoir la meilleure stabilité en solution de **C1** par rapport à **C2**. De plus, ces études théoriques indiquent qu'en présence d'acétate, seul le ligand **L2** devrait être totalement déplacé, ce qui mènerait à la formation d'acétate de cuivre. Par contre, le ligand **L1** formerait un complexe suffisamment stable avec l'ion cuivrique pour subsister en solution. Lors des évaluations de ces énergies de stabilisation, la contribution due à la solvation des différents partenaires peut être déterminante. Notons ici que la rapidité d'exécution de SIBFA permet d'inclure les effets de solvant dans le processus de modélisation. En l'occurrence, nous avons réalisé en quelques heures les différentes optimisations dans un champ continu mimant le milieu aqueux.

^{*} Le cuivre à l'étage d'oxydation +1, à couche complète, avait déjà fait l'objet d'un développement antérieur de la méthode SIBFA⁶⁵⁴.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les facteurs structuraux entrant en compte dans la stabilisation du complexe **C1**. L'étude des dérivés tronqués, **C1a-bis** et **C2a-bis** a permis d'étudier l'influence de la position de l'amide au sein des ligands **L1** et **L2**. On observe que le complexe **C2a-bis** formant des cycles chélate à cinq membres est le plus stable, suivant ainsi les règles générales de chimie de coordination. La stabilisation de **C1** provient donc principalement du cycle triméthoxyphényle directement branché sur l'amide. Pour comprendre l'origine de cette très forte stabilisation, il faut retourner à la structure du ligand **L1**: en effet, l'agencement des atomes permet une certaine délocalisation des électrons du cycle vers l'oxygène donneur, délocalisation encore renforcée par la présence de substituants méthoxys en position *ortho* du cycle aromatique. Par contre, **C2** bénéficie moins des effets stabilisants de ce cycle aromatique, puisqu'un groupement méthylène vient s'intercaler entre le phényle et l'amide, empêchant ainsi une délocalisation électronique.

Nous nous sommes ensuite intéressée à l'influence des substituants méthoxys sur la stabilisation du complexe **C1**. Les méthoxys positionnés en *ortho* du cycle aromatique prennent indiscutablement part à la stabilisation du complexe. L'effet du *meta*-méthoxy est, par contre, plus ambigu : selon le type de comparaison effectué, il apparaît soit légèrement stabilisant, soit déstabilisant. Intuitivement, on se rend compte que ces résultats concordent avec les théories de mésomérie abordées en chimie organique de base, comme présenté à la figure 3.14.

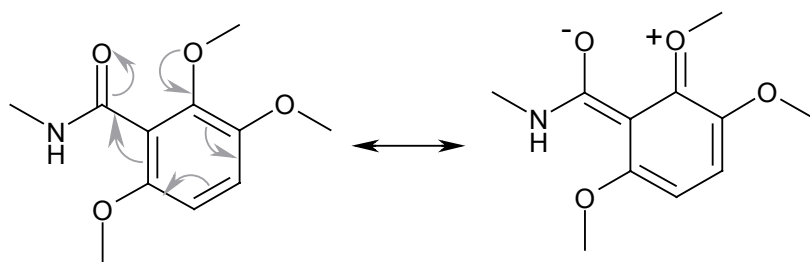


Figure 3.14. Les formes mésomères engendrées par les *ortho*-méthoxys contribuent à renforcer la densité électronique au niveau de l'oxygène impliqué dans la coordination au cuivre. Elles stabilisent donc la formation du complexe **C1**.

L'analyse des différentes contributions à l'énergie de stabilisation des dérivés de **C1** montre l'importance des termes électrostatiques et répulsifs. Si l'ajout de substituants méthoxys est défavorable d'un point de vue répulsif, le gain au niveau électrostatique est important. Dans ce contexte, il est possible de caractériser un

complexe métallo-organique en étudiant le potentiel électrostatique moléculaire engendré par les ligands au niveau du centre métallique⁷³³. En effet, le calcul des PEM peut donner une certaine idée de la stabilité d'un complexe. Il faut toutefois garder à l'esprit que la contribution électrostatique n'est qu'une contribution énergétique parmi d'autres et ne donne, dès lors, pas accès à une énergie de stabilisation globale. La valeur des puits de potentiel obtenue suite à ces calculs *ab initio* peut être directement mise en rapport avec le terme électrostatique fourni par SIBFA. En effectuant cette comparaison, nous avons observé une bonne corrélation entre les valeurs énergétiques obtenues par mécanique quantique et par SIBFA. La méthode SIBFA pourrait donc, dans une certaine mesure, fournir également des indications sur des propriétés électroniques telles que les PEM.

Pour conclure ce travail, nous pouvons dire que les premiers résultats obtenus suite à l'élargissement de la procédure SIBFA aux complexes au cuivre (II), sont prometteurs. Au cours de ce chapitre, nous avons étudié théoriquement les propriétés énergétiques fines d'une série de complexes au cuivre (II) à visée thérapeutique, en étroite adéquation avec les résultats empiriques obtenus précédemment. Nous disposons maintenant d'une méthode prédictive permettant d'appréhender la stabilité thermodynamique des complexes au cuivre (II). Il est, dès lors, possible de l'appliquer dès le début du processus de conception de nouveaux complexes, avant les étapes de synthèse et de caractérisation expérimentale.

Afin de pousser plus loin la validation de la méthode, on pourrait également comparer systématiquement les énergies de stabilisation obtenues par SIBFA et les constantes d'équilibres tabulées pour diverses séries de complexes⁷³⁴. A plus long terme, il serait intéressant de peaufiner l'adaptation de SIBFA à l'ion cuivrique. En effet, la version de SIBFA que nous avons utilisée au cours de cette thèse souffre de certaines limitations. Nous avons vu que l'ion cuivrique possédait une configuration électronique à couche ouverte, en d^9 . Cette caractéristique le rend particulièrement sensible aux effets du champ des ligands, provoquant au sein des complexes qu'il forme des déformations géométriques typiques. Cet effet Jahn-Teller conduit ainsi les complexes au cuivre (II) à adopter préférentiellement des géométries soit octaédriques déformées tétraгонаlement, soit pyramidales à base carrée, soit encore en plan carré. Pour modéliser correctement les propriétés géométriques et énergétiques des complexes au cuivre (II), il semble indispensable d'inclure au sein de la procédure un

terme supplémentaire permettant de rendre compte des effets du champ des ligands. Il serait intéressant de voir si la prise en compte de tels effets provoque, comme le prévoit la théorie de Jahn-Teller, une stabilisation complémentaire des complexes. On pourrait également aborder la modélisation des complexes SETCEZ et **C0** qui adoptent, à l'état cristallin, notamment des géométries pyramidales à plan carré. Il serait alors possible d'étudier l'influence des molécules en position apicale sur la stabilité du complexe, comme dans le cas de **C01** qui a été cristallisé sous deux formes, avec ou sans une molécule de solvant assurant la sixième coordination. A l'heure actuelle, une nouvelle version de SIBFA reprend ces effets de champ des ligands⁶⁵⁷. Les premiers résultats permettent de reproduire correctement la géométrie des complexes au cuivre formés à partir de ligands neutres comme l'eau ou l'ammoniac, ainsi que les phénomènes énergétiques qui y sont associés. A ce stade de développement, SIBFA peut être considérée comme une des méthodes de tout premier plan pour modéliser par mécanique moléculaire les complexes formés à partir de l'ion cuivrique.

"Life can only be understood backward, but must be lived forward"

S. KIERKEGAARD

En quelques décennies, le virus d'immunodéficience humaine a provoqué l'épidémie la plus ravageuse de l'histoire contemporaine. Les derniers bilans faisant état de la progression du SIDA dans le monde parlent maintenant de plus de 38 millions de personnes infectées et de plus de 20 millions de décès depuis que l'on a recensé les premiers cas de la maladie en 1981. L'épidémie touche de manière inégale les différentes régions de la planète, atteignant, par exemple, des proportions apocalyptiques dans certains pays d'Afrique subsaharienne. Parmi les grands défis de ce début de siècle, on peut citer notamment l'amélioration de l'accès aux traitements antirétroviraux qui ne sont disponibles actuellement que pour environ 7% de personnes atteintes par le virus. Des efforts doivent, en outre, être soutenus dans la recherche de vaccins ou de nouveaux traitements anti-VIH¹⁰.

A l'heure actuelle la plupart des médicaments existant sur le marché visent deux enzymes nécessaires à la réplication virale : la transcriptase inverse et la protéase. La découverte des premiers inhibiteurs de la protéase suscita de grands espoirs au sein de la communauté scientifique. Pour la première fois, on pouvait envisager un traitement à plus long terme des personnes atteintes par le SIDA, qui retrouvaient ainsi une qualité de vie presque normale. Cependant, l'enthousiasme initial est retombé. Les antiprotéases de première génération présentent en effet des problèmes de biodisponibilité et de toxicité importants. L'efficacité de ces molécules est, en outre, rapidement hypothéquée par l'apparition de souches virales mutantes résistant au traitement. Pour remédier à ces inconvénients, de nombreuses équipes de chercheurs se sont attelées à la conception de nouvelles générations d'antiprotéases, faisant de cet enzyme une des cibles thérapeutiques les plus étudiées.

Une étude de conception *de novo* d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 a été entreprise au laboratoire de chimie moléculaire structurale. Elle a mené à l'identification d'un complexe métallo-organique au cuivre (II), SETCEZ, chef de file d'une famille originale d'anti-protéases^{483,669}. Les potentialités de l'approche bio-inorganique n'avaient jusqu'alors, pour la protéase, pas été explorées dans une optique de '*rational drug design*' et ouvraient donc un champ d'investigation quasi vierge dans ce domaine. A la suite du processus d'optimisation de SETCEZ, plusieurs ligands furent synthétisés et complexés à l'ion cuivrique. Certains complexes firent alors preuve d'une activité inhibitrice environ 500 fois supérieure à celle de leur chef de file (Figure 1). Ces résultats intéressants étaient cependant difficilement explicables *a*

priori et nécessitaient une étude approfondie des relations existant entre la structure et l'activité de ces composés.

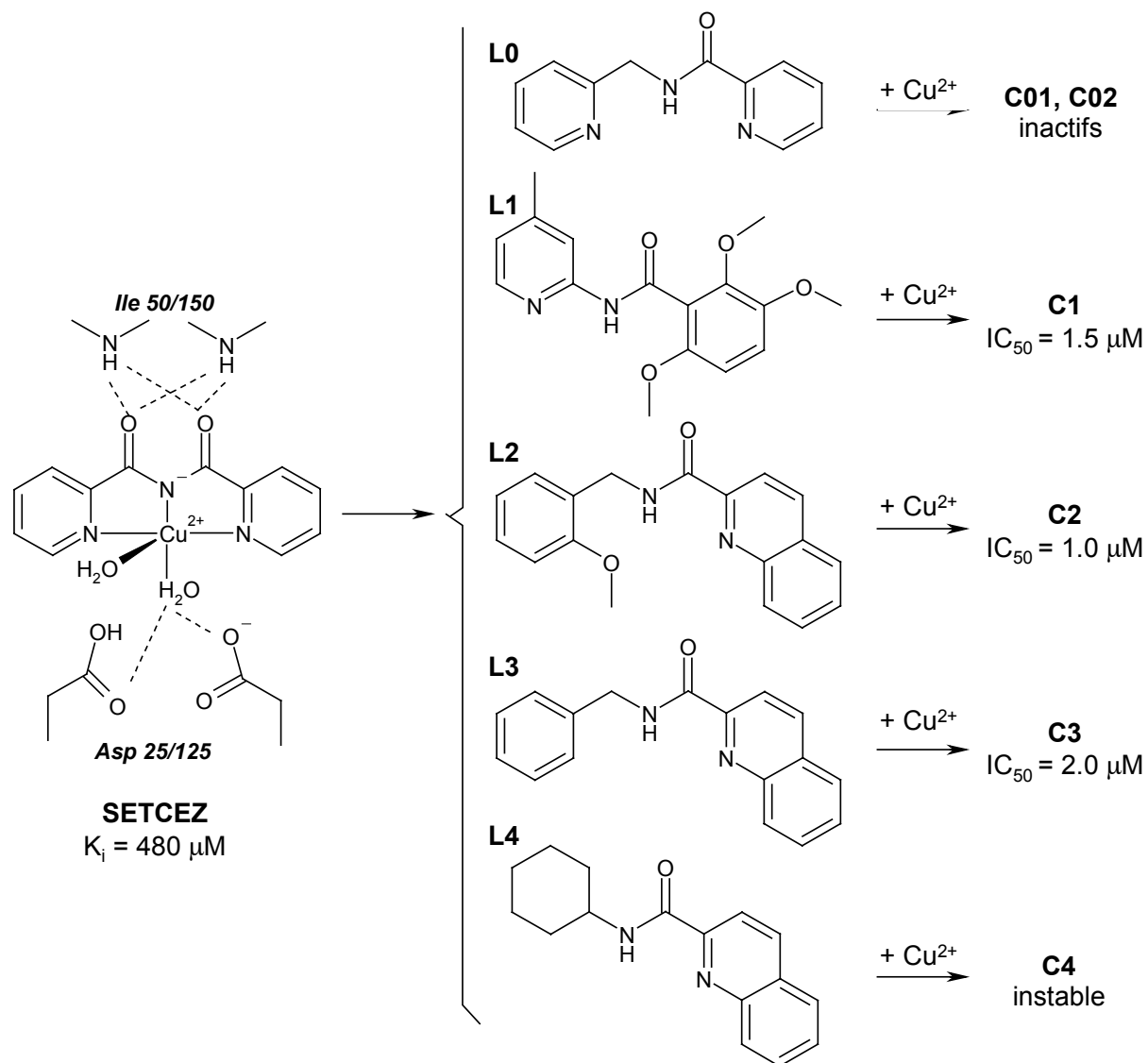


Figure 1. La conception *de novo* d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 a conduit à l'identification d'un complexe au cuivre (II), SETCEZ. L'optimisation de cette molécule chef de file a débouché sur la synthèse des ligands **L0-4**, qui ont ensuite été complexés à l'ion cuivrique. Les complexes correspondant **C0-4** présentent des activités inhibitrices diverses, pouvant être jusqu'à 500 fois plus élevées que celle de SETCEZ.

Notre travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de cette recherche initiale, en y imprimant un caractère bio-inorganique marqué. Nous avons, en effet, tenté ici d'explorer la piste de l'inhibition de la protéase par les complexes métallo-organiques au cuivre (II), en nous focalisant sur le comportement physico-chimique, sur les potentialités et sur les limitations spécifiques à ce type de complexe de coordination.

Les objectifs de cette thèse peuvent se résumer en quelques points. Il s'agissait tout d'abord de caractériser les propriétés structurales et physico-chimiques des complexes **C0-4**, afin de clarifier leur mode d'interaction avec la protéase. Sur ces bases, des relations existant entre la structure des complexes et leur activité inhibitrice devaient être établies pour dégager les critères nécessaires à une inhibition compétitive de l'enzyme par cette famille de complexes au cuivre (II). Ces critères, repris au sein d'un pharmacophore optimisé, devaient enfin permettre de proposer une nouvelle génération d'inhibiteurs de nature métallo-organique.

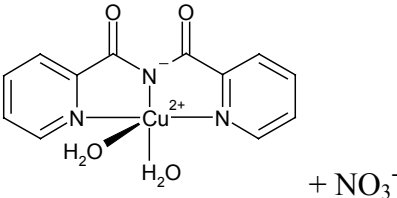
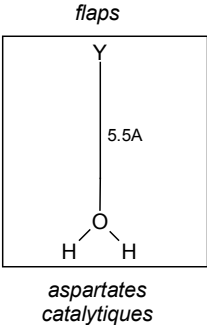
Les complexes qui ont fait l'objet de ce travail peuvent se classer en quatre catégories selon leur mode d'inhibition vis-à-vis de la protéase. Ainsi, le complexe au cuivre SETCEZ peut être considéré comme la molécule chef de file à l'origine de cette étude (Tableau 1.). C'est un inhibiteur compétitif faiblement actif. Deux complexes, **C01** et **C02**, ont été formés à partir du ligand **L0** (Tableau 2.). Ils ne présentent aucune activité inhibitrice dans les limites de leur solubilité. **C1**, sous sa forme complexée inhibe compétitivement la protéase (Tableau 3.). On observe une activité anti-enzymatique environ 500 fois plus élevée que celle de SETCEZ. Enfin nous avons montré que **C2**, **C3** et **C4** ne subsistent pas sous forme de complexe dans les tampons utilisés en cinétique (Tableau 4.). L'activité antiprotéolytique observée est attribuée à l'ion cuivrique libéré dans le milieu suite au processus de décomplexation.

La caractérisation cristallographique, les études de mécanique moléculaire ainsi que la détermination de l'activité biologique du complexe SETCEZ avaient fait l'objet d'études antérieures^{483,489}. Ces dernières plaident en faveur d'une inhibition purement compétitive de la protéase par le complexe observé en DRX. La modélisation de SETCEZ au sein du site actif de l'enzyme avait par ailleurs montré l'importance de la molécule d'eau coordinant le cuivre (II) dans le plan du ligand et formant des ponts hydrogène avec les aspartates catalytiques, ainsi que celle des deux fonctions carbonyles jouant le rôle d'accepteurs de protons (symbolisé par la lettre Y) dans l'interaction avec les isoleucines 50/150 des flaps (Tableau 1.). SETCEZ était cependant trop peu volumineux pour atteindre les différents sous-sites de l'enzyme, ce qui expliquait la faible activité inhibitrice observée.

Nous avons complété ces résultats par des études en solution : la spectrométrie de masse confirme que l'espèce majoritaire en solution est bien un complexe semblable à celui observé en cristallographie et comprenant un ligand tridentate chélatant l'ion cuivrique. Le ligand libre, par contre, n'est observable que sous forme de traces. Par ailleurs, on obtient en RPE, un signal propre à SETCEZ dans le méthanol. Dans le tampon acétate utilisé lors des tests enzymatiques, ce signal subsiste

et est clairement différent de celui de l'acétate de cuivre. Il est donc clair que SETCEZ reste sous forme complexée quel que soit le milieu étudié.

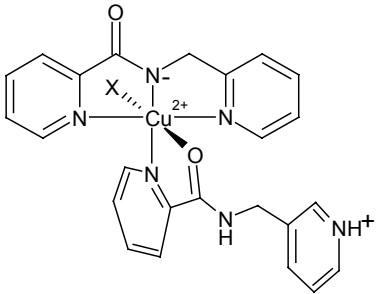
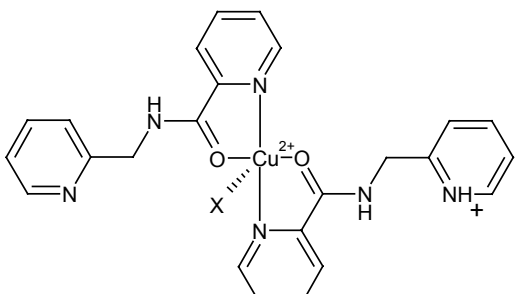
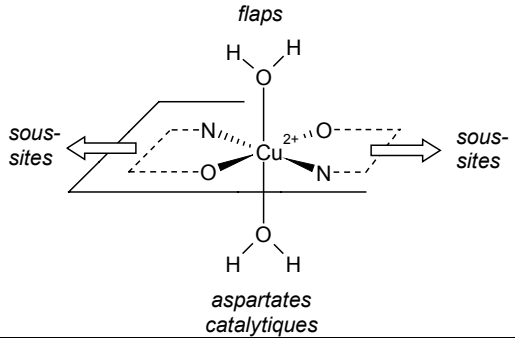
Tableau 1. : Récapitulatif des résultats expérimentaux et théoriques concernant le chef de file, SETCEZ.

	SETCEZ
DRX	complexe ⁴⁸⁹ : 
MM	interaction avec les résidus catalytiques et les flaps ⁴⁸³ : 
ESI-MS	complexe majoritaire : $L - H^+ + Cu^{2+}$
RPE	complexe: spectre différent de celui de l'acétate de cuivre ; pas d'influence du solvant
SIBFA	/
BIO	inhibition compétitive: $K_i = 480 \mu M$ ⁴⁸³

La complexation du ligand **L0** à l'ion cuivrique issu de deux sels différents donna naissance à deux types distincts de complexes cristallographiques : **C01** et **C02** (Tableau 2). On peut décrire **C01** comme un complexe formé à partir de deux ligands organiques : le premier ligand, tridentate, chélatant le cuivre (II) par les deux azotes pyridiniques et l'azote déprotoné de l'amide, à la manière de SETCEZ, et le second ligand, bidentate, impliquant un azote pyridinique et l'oxygène amidique. De plus, **C01** cristallise sous deux formes qui diffèrent principalement par leurs paramètres de maille et par la présence ou non d'une molécule de solvant assurant la sixième

coordination. **C01** ne peut s'insérer dans le site actif de la protéase car le second ligand bidentate génère une gêne stérique au niveau des aspartates catalytiques. Un tel complexe est donc incapable de faire preuve d'activité anti-enzymatique.

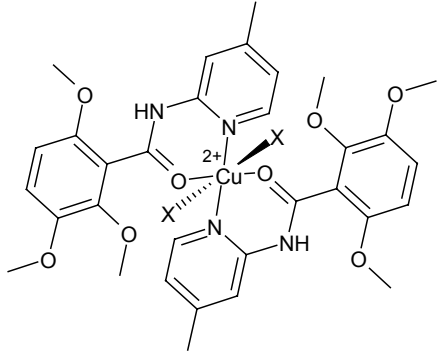
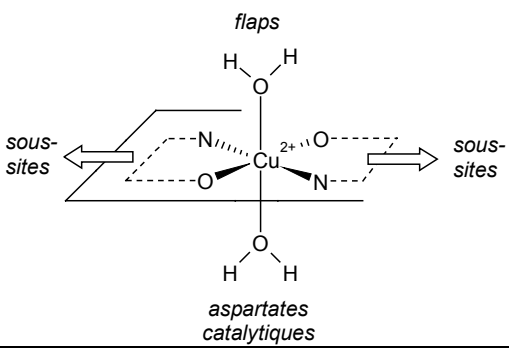
Tableau 2. Récapitulatif des résultats expérimentaux et théoriques concernant les complexes formés à partir du ligand **L0**. En solution, on ne retrouve que le complexe **C01**. Celui-ci ne peut s'insérer dans le site actif de la protéase, ce qui explique l'absence d'activité inhibitrice.

	C01	C02
DRX	<p>complexe:</p>  <p>a) X = EtOH + 2 ClO₄⁻ b) X = rien + 2 ClO₄⁻ + 2 H₂O</p>	<p>complexe:</p>  <p>X = H₂O + 3 PF₆⁻</p>
MM	encombrement stérique	<p>interaction avec les résidus catalytiques, les flaps et les sous-sites enzymatiques</p> 
ESI-MS	<p>ligand majoritaire pour C01 et en proportions importante pour C02</p> <p>complexes présents : L - H⁺ + Cu²⁺ et 2L - H⁺ + Cu²⁺ (= C01)</p> <p>complexe non observé : 2L + Cu²⁺ (= C02)</p>	
RPE	complexe: comportement similaire à celui de SETCEZ plaidant en faveur du même type de complexation (= C01)	
SIBFA	/	
BIO	pas d'inhibition dans les limites de la solubilité (1.10 ⁻⁴ M)	

Par contre, à l'état cristallin, **C02** implique deux ligands bidentates symétriques complexant l'ion cuivrique central *via* un azote pyridinique et l'oxygène amidique. Une molécule d'eau occupe, en outre, la position apicale de ce complexe pyramidal à base carrée. Nous avons modélisé, par mécanique moléculaire, l'interaction de **C02** avec la protéase, en ajoutant une molécule d'eau complémentaire en position apicale. En vertu du théorème de Jahn-Teller, les complexes au cuivre (II) adoptent, en effet, une géométrie octaédrique déformée tétragonalement dont les cas limites sont la pyramide à base carrée et le plan carré. Il est donc probable que **C02** puisse accommoder une deuxième molécule d'eau apicale pour former un octaèdre déformé tétragonalement. Ces molécules d'eau ont de l'importance car elles permettent une interaction non seulement avec les aspartates catalytiques comme le prévoyait le pharmacophore initial, mais également avec certains résidus des flaps, prenant ainsi la place de l'accepteur de proton Y. Les ligands organiques s'organisent dans un plan perpendiculaire à celui de SETCEZ, ce qui leur permet de mieux s'adapter aux sous-sites S1/S1' et S2/S2' de l'enzyme. Ce mode de complexation devrait donc permettre une organisation adéquate des différents éléments d'interaction avec les résidus clés de la protéase : les résidus du site catalytique, des flaps et des différents sous-sites enzymatiques. Cependant, les travaux de spectrométrie de masse et de RPE ont montré qu'en solution, seul le complexe **C01**, ou son dérivé ne comprenant qu'un seul ligand tridentate, existaient. Il est donc impossible d'observer l'activité inhibitrice à laquelle on pouvait s'attendre pour **C02**, sur base des études de modélisation moléculaire.

Tout comme **C02**, **C1** est formé à l'état cristallin à partir de deux ligands bidentates symétriques (Tableau 3.). Les positions apicales de cet octaèdre déformé tétragonalement sont occupées par deux molécules de méthanol issues du solvant de cristallisation. Lors de la modélisation moléculaire de **C1** en interaction avec la protéase, nous avons remplacé ces molécules de méthanol labiles par de l'eau. De nouveau, le mode de complexation de **C1** permet d'organiser correctement les différents éléments d'interaction à l'intérieur du site actif de l'enzyme. En solution, les données de spectrométrie de masse montrent que l'espèce majoritaire est bien le complexe observé en cristallographie même si elle côtoie une proportion importante de ligand libre. En RPE, le spectre de **C1** obtenu dans le tampon acétate peut être considéré comme la résultante de la superposition de deux signaux : celui propre au complexe **C1**, observé également dans le méthanol, et celui de l'acétate de cuivre. Par ailleurs, l'évaluation théorique des stabilités relatives des complexes par la méthode SIBFA prévoit que **C1** est plus stable que l'acétate de cuivre.

Tableau 3. : Récapitulatif des résultats expérimentaux et théoriques concernant le complexe **C1**. **C1** est suffisamment stable pour subsister partiellement sous sa forme complexée en solution, dans le tampon utilisé lors des tests enzymatiques. Il peut donc inhiber de manière compétitive la protéase.

	C1
DRX	<p>complexe:</p>  <p>X = MeOH + 2 ClO₄⁻</p>
MM	<p>Interaction avec les résidus catalytiques, les flaps et les sous-sites enzymatiques :</p>  <p>flaps</p> <p>sous-sites</p> <p>aspartates catalytiques</p>
ESI-MS	<p>complexe majoritaire : 2L + Cu²⁺</p> <p>ligand présent en proportion importante</p>
RPE	<p>complexe: spectres différents selon le milieu (méthanol ou tampon acétate)</p> <p>dans le tampon acétate, superposition de deux signaux : celui propre au complexe C1 et celui de l'acétate de cuivre.</p>
SIBFA	<p>$\Delta E_{\text{stab}} \text{ C1} > \Delta E_{\text{stab}} \text{ acétate de cuivre}$</p> <p>stabilisation due principalement aux groupements triméthoxyphényles donneurs</p>
BIO	<p>C1 : inhibition compétitive : $K_i = 1\mu\text{M}$</p> <p>Cu²⁺ libre : inhibition non compétitive (Cys67/167 et 95/195) : $K_i = 1\mu\text{M}$</p>

Enfin, deux types d'inhibition sont observés : une inhibition compétitive due au complexe et nettement supérieure à celle du chef de file SETCEZ, et une inhibition

non compétitive due au cuivre (II) libéré suite à la décomplexation de **C1**, et agissant au niveau des cystéines 67/167 et 95/195. Tous ces éléments concordent pour affirmer que **C1** est suffisamment stable pour subsister, au moins partiellement, sous forme complexée dans le tampon enzymatique, et inhiber de manière compétitive la protéase.

Enfin, les ligands **L2**, **L3** et **L4** sont tous basés sur le motif quinoléine carboxamide (Tableau 4.). En cristallographie, nous avons obtenu les complexes **C2** et **C4**, formés par deux ligands bidentates symétriques chélatant l'ion central *via* l'oxygène amidique et l'azote quinoléique. Les positions apicales sont occupées par deux contre-ions perchlorate. L'ion cuivrique pourrait donc de nouveau jouer le rôle d'agent structurant organisant ses ligands suivant une géométrie octaédrique déformée tétragonalement, ce qui leur permet d'interagir de manière adéquate avec les résidus clés du site actif de la protéase. Les études de mécanique moléculaire confirment bien cette hypothèse. Par contre, il n'a pas été possible de cristalliser **C3** sous sa forme complexée.

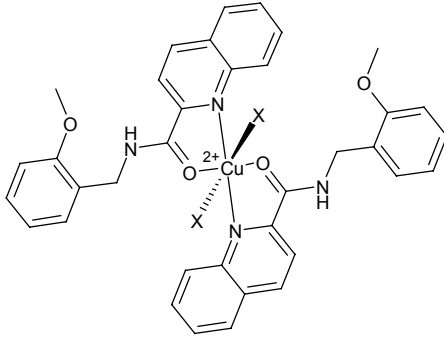
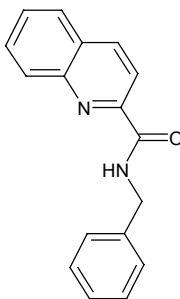
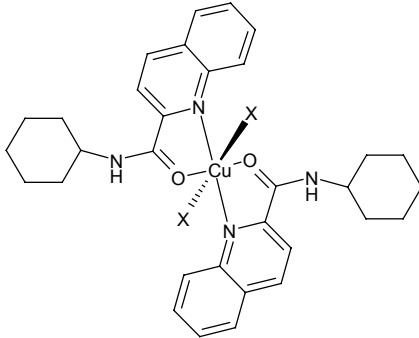
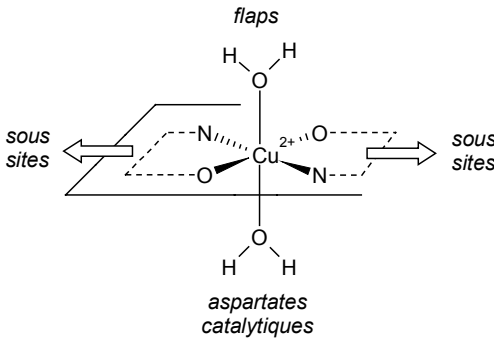
Par ailleurs, la spectrométrie de masse nous montre, pour **C2** et **C3**, que l'espèce prédominante en solution est le ligand libre, le complexe n'étant décelable qu'en petite proportion. Dans le cas de **C4**, on observe une plus grande quantité de complexe en solution, mais il côtoie des proportions importantes de ligand libre. Les résultats de RPE sont plus parlants encore : dans le tampon acétate, on obtient uniquement le signal de l'acétate de cuivre, ce qui prouve une décomplexation totale et une libération du cuivre (II) dans le milieu. La prédiction de la stabilité de **C2** et **C3** par SIBFA est en accord avec ces résultats expérimentaux : **C2** et **C3** sont moins stables que l'acétate de cuivre, et **C3** est lui-même moins stable que **C2**, ce qui pourrait expliquer le fait que nous n'ayons pas pu le cristalliser sous forme complexée. Il devient évident que ces trois composés ne sont pas suffisamment stables pour rester complexés dans le tampon utilisé en cinétique ; c'est alors le cuivre (II) libéré dans le milieu qui est responsable de l'inhibition observée.

Cette caractérisation expérimentale et théorique nous permet d'épingler deux critères importants dans la conception d'inhibiteurs métallo-organiques de la protéase du VIH-1.

D'une part, l'utilisation de l'ion cuivrique en tant qu'agent structurant permettant l'organisation des différents éléments d'interaction au sein du site actif de l'enzyme, est judicieuse. En effet, le cuivre (II) est soumis à l'effet Jahn-Teller : lors de la complexation, il adopte typiquement une géométrie octaédrique déformée tétragonalement. Il est intéressant de profiter des positions apicales plus labiles pour accommoder deux molécules d'eau cruciales dans l'inhibition de l'enzyme, la

première permettant d'interagir avec les aspartates catalytiques, et la seconde avec certains résidus des flaps.

Tableau 4. Récapitulatif des résultats expérimentaux et théoriques concernant les complexes **C2**, **C3** et **C4**. Dans les conditions des tests enzymatiques, on observe une décomplexation totale de ces composés. L'activité inhibitrice observée ne peut, dès lors, qu'être attribuée au cuivre (II) libéré dans le milieu.

	C2	C3	C4
DRX	<div>complexe :</div> <div></div> <div>X= ClO₄⁻</div>	<div>ligand :</div> <div></div>	<div>complexe :</div> <div></div> <div>X = ClO₄⁻</div>
MM	<div>interaction avec les résidus catalytiques, les flaps et les sous-sites enzymatiques :</div> <div></div>		
ESI-MS	<div>ligand majoritaire</div> <div>complexe présent en faible proportion : 2L + Cu²⁺</div>	<div>ligand en proportion importante</div> <div>complexe majoritaire : 2L + Cu²⁺</div>	
RPE	<div>complexe: spectres différents selon le milieu (méthanol ou tampon acétate)</div> <div>dans le tampon acétate, le signal est identique à celui de l'acétate de cuivre</div>		
SIBFA	<div>ΔE_{stab} acétate de cuivre > ΔE_{stab} C2 > ΔE_{stab} C3</div>		/
BIO	<div>les complexes ne subsistent pas en milieu biologique : inactifs</div> <div>Cu²⁺ libre : inhibition non compétitive (Cys67/167 et 95/195) : K_i = 1μM</div>		

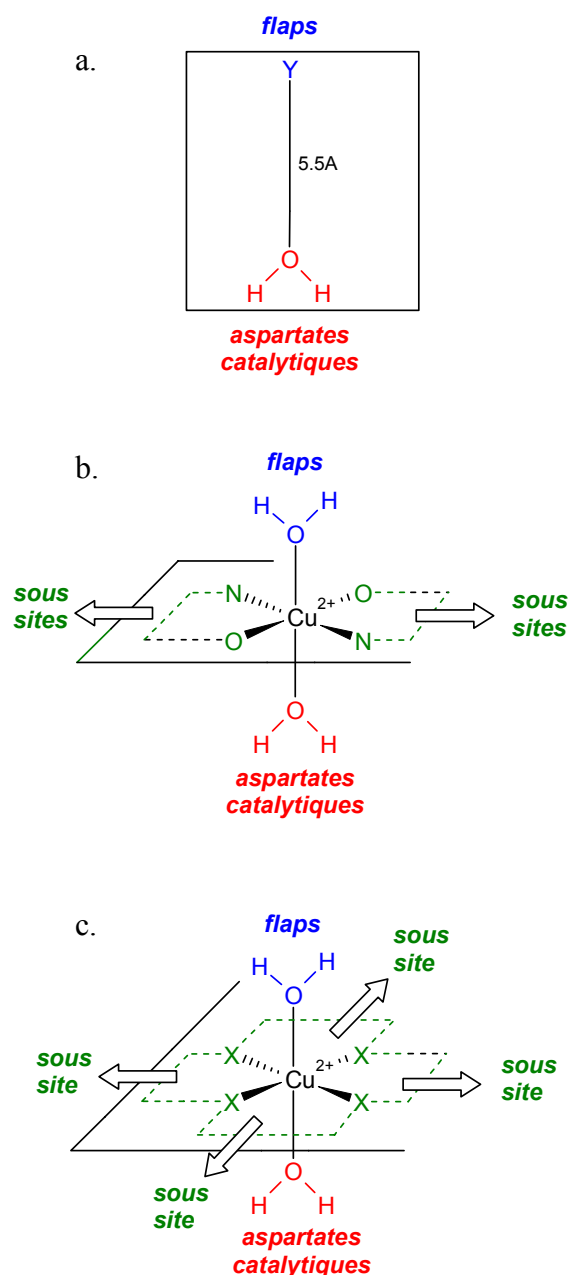


Figure 2. Affinement du pharmacophore dédié aux inhibiteurs métallo-organiques de la protéase du VIH-1. a. Pharmacophore initial ayant permis d'épingler le chef de file, SETCEZ. b. Pharmacophore décrivant le mode d'interaction de **C1** avec l'enzyme. c. Pour améliorer la stabilité des complexes, on pourrait envisager des ligands multidentates de type macrocycliques. X représente ici les atomes donneurs tels que l'azote ou l'oxygène coordonnant le métal.

L'inhibiteur métallo-organique inclut donc directement au sein de sa structure la molécule d'eau catalytique, qui ne peut jouer ici son rôle de nucléophile, et la molécule d'eau structurale présente dans la plupart des structures d'inhibiteurs peptidomimétiques cocrystallisés avec la protéase. En outre, le plan équatorial formé par les ligands organiques permet d'orienter les différents groupements au sein des principaux sous-sites enzymatiques S1/S1' et S2/S2' (Figure 2.b.).

D'autre part, nous devons pondérer notre optimisme par le comportement thermodynamique des complexes en solution. Pour inhiber la protéase par le mécanisme décrit ci-dessus, il est évident que l'inhibiteur métallo-organique doit rester sous forme complexée lorsqu'il interagit avec l'enzyme. La stabilité des complexes en milieu biologique devient, dès lors, une propriété incontournable.

Nous l'avons abordée sous un éclairage théorique en participant à l'élargissement de la procédure SIBFA aux systèmes comprenant du cuivre (II). Les énergies de stabilisation des complexes **C1**, **C2** et de leurs dérivés (**C1b-g**, **C3**), que nous avons obtenus grâce à ce champ de forces polarisable, sont en accord avec les données expérimentales. SIBFA peut donc être considéré comme une méthode de choix permettant d'appréhender le

comportement énergétique des complexes au cuivre (II) et de prédire leur stabilité.

Nous avons vu que de nombreux facteurs intervenaient dans le processus de stabilisation d'un complexe, tels que la nature du métal ou celle des ligands. Le cuivre (II) semble être un métal adéquat pour agir en tant qu'agent structurant d'inhibiteur de la protéase puisque l'effet Jahn-Teller stabilise les complexes de géométrie octaédrique déformés tétragonalement. Il reste donc la possibilité de modifier les ligands afin d'obtenir des complexes plus stables. On peut jouer sur la nature des atomes impliqués dans la coordination, augmenter la basicité du ligand, favoriser la formation de plusieurs cycles chélates à partir d'un seul ligand, proposer des ligands déjà préorganisés pour la complexation, etc...^{706,707,709,712}

Ainsi, le pharmacophore repris à la figure 2.c., devrait correspondre à des complexes plus stables : on y retrouve, en plus de la possibilité de former les différentes interactions avec les résidus clés de la protéase, un ligand tétradentate formant simultanément jusqu'à quatre cycles chélates, dans le cas d'une structure macrocyclique. Plusieurs familles de complexes pourraient répondre à cette description et former ainsi une nouvelle génération d'inhibiteurs métallo-organiques plus stables, donc susceptibles d'interagir compétitivement avec l'enzyme (Figure 3.).

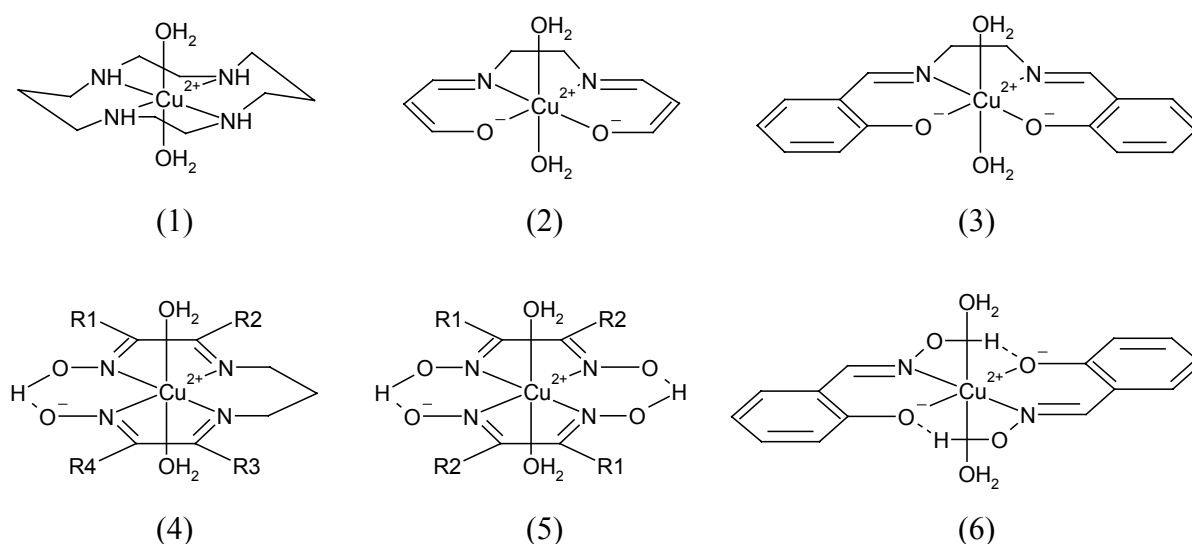


Figure 3. Exemples de complexes au cuivre (II) pouvant servir de point de départ à une nouvelle génération d'inhibiteurs métallo-organiques de la protéase. On retrouve en effet la possibilité de complexer deux molécules d'eau apicales et d'orienter divers substituants vers les sous-sites enzymatiques à partir des ligands équatoriaux.

Par exemple, la stabilité des complexes formés à partir des ligands de type ‘cyclam’ (1) et de l’ion cuivrique est bien connue ; elle est due à ce qu’on appelle l’effet macrocyclique : un ligand multidentate linéaire forme des complexes moins stables que son homologue cyclique car il doit perdre un plus grand nombre de degré de liberté lors de la complexation. Les ‘cyclam’ possèdent cependant une certaine flexibilité qui leur permettent d’adopter plusieurs conformations lorsqu’ils sont complexés.

Des complexes rigidifiés par la présence de doubles liaisons pourraient présenter l’avantage de ne pas induire la formation de carbone asymétrique lors de leur substitution en vue d’atteindre les sous-sites enzymatiques. Formant simultanément trois cycles chélates, ils devraient présenter une stabilité suffisante pour être utilisés à des fins thérapeutiques. Ce type de ligand ‘acacen’ (2) complexé au cobalt (III) est d’ailleurs étudié dans le cadre de l’inhibition de la thrombine et de la thermolysine^{559,560}, comme nous l’avons mentionné à la page 82 de l’introduction générale. De même, les ‘salen’ (3), dérivant de cette famille, sont développés en tant qu’agents anti-cancéreux^{598,599,735} (voir aussi page 86)*.

Pour simuler la stabilisation due à l’effet macrocyclique, on peut également envisager la formation de ponts hydrogène intramoléculaires comme dans le cas du complexe (4). Certains agents de diagnostic possèdent des structures similaires, comme par exemple le Ceretec⁵⁶¹ illustré à la page 83 de l’introduction générale. Remarquons, dès à présent, que les noyaux (2), (3) et (4) possèdent comme élément de symétrie un plan miroir. Or, nous pouvons rappeler que les sous-sites de la protéase sont, eux aussi, disposés symétriquement, mais selon une symétrie d’axe d’ordre 2. Lors de l’étape de substitution de ces noyaux, nécessaire pour atteindre les sous-sites enzymatiques, il faudra donc aller à l’encontre de leur propre symétrie, ce qui peut poser des problèmes de synthèse. Prenons, par exemple, le noyau (4). Une recherche dans CSD basée sur ce fragment permet de trouver 46 complexes substitués en position R1, R2, R3 et R4 ; dans tous les cas, on retrouve comme élément de symétrie le plan miroir : R1 = R4 et R2 = R3. Par contre, on peut garder une structure assez semblable mais résoudre ce problème de symétrie si on passe à des complexes formés à partir de deux ligands bidentates, de type ‘dmg’ (5). Ici aussi, l’effet macrocyclique est mimé par deux ponts hydrogène entre ligands, ce qui assure une meilleure stabilité

* Des contacts ont été pris avec le laboratoire de chimie organique physique du Professeur Bernier à Lille qui synthétise et étudie les propriétés anticancéreuses des complexes ‘salen’ et de leurs dérivés. Grâce à cette collaboration, la synthèse de ‘salen’ modifiés en vue d’inhiber la protéase pourrait être envisagée.

au complexe formé. On pourrait facilement envisager deux substituants en R1 et R2 permettant l'interaction avec les sous-sites S1/S1' et S2/S2'.

Dans le même ordre d'idée, il est également possible de développer des inhibiteurs à partir du complexe (6), stabilisé lui aussi par deux ponts hydrogène entre ligands. On se rapproche ici de la structuration des complexes qui ont été caractérisés au cours de cette thèse, avec l'intervention de l'azote et de l'oxygène de chaque ligand organique dans la coordination. On pourrait donc imaginer ce genre de stabilisation en modifiant légèrement la structure des ligands que nous avons étudiés. La figure 4. reprend des exemples de modifications envisageables pour **L1** et **L2** qui mèneraient à la formation de ponts hydrogène entre ligands et donc à une stabilisation de type 'pseudo' macrocyclique lors de leur complexation.

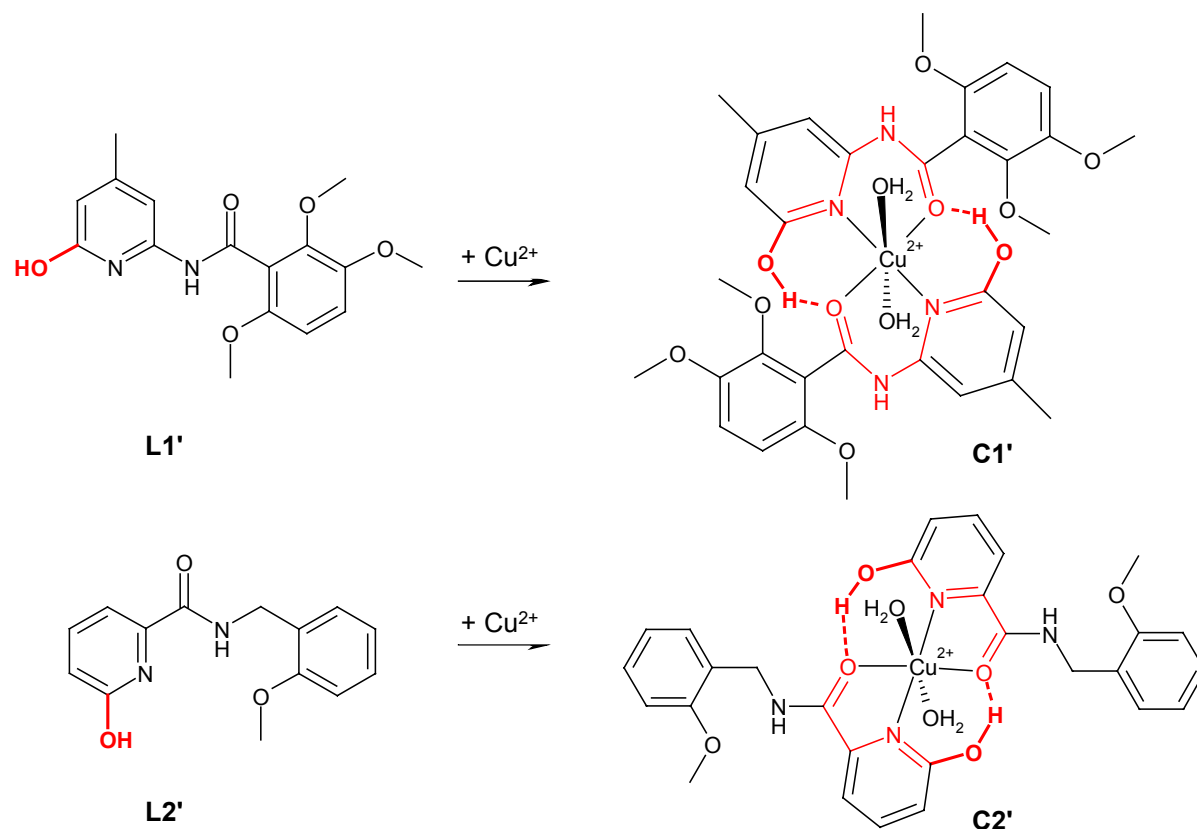


Figure 4. Exemples de modifications structurales pouvant mener à une stabilisation 'pseudo'-macrocyclique de **C1** et **C2**. Dans le cas de **L1**, seul un groupement hydroxyle est ajouté en *ortho* de la pyridine. Dans le cas de **L2**, une pyridine, de nouveau substituée en *ortho* par un hydroxyle, remplace la quinoléine.

Ainsi, nous avons utilisé la méthode SIBFA pour étudier l'influence de l'ajout de substituants hydroxyles en *ortho* des groupements pyridiniques sur stabilité du complexe **C1**. Nous avons également modélisé l'interaction de ce nouveau complexe

C1' avec la protéase par mécanique moléculaire classique à l'aide du champ de forces ESFF. Afin de pouvoir comparer les deux complexes, nous avons suivi les mêmes protocoles de calcul que ceux appliqués à **C1**.

La structure de **C1'** et les résultats énergétiques obtenus suite au processus de minimisation par SIBFA se trouvent respectivement à la figure 5. et au tableau 5. D'un point de vue structural, la méthode SIBFA permet bien de retrouver les deux ponts hydrogène formés entre les ligands, ce qui donne une allure macrocyclique à l'ensemble du complexe. Cependant, on observe également un éloignement des azotes pyridiniques par rapport à l'ion cuivrique : les distances N-Cu sont supérieures à 2.4 Å, ce qui laisse penser que la liaison correspondante est nettement affaiblie. Dès lors, deux hypothèses peuvent être envisagées. La première consisterait à dire que la taille du 'pseudo'-macrocycle est trop élevée ; la formation simultanée de quatre 'cycles' chélates à six membres créerait une cavité trop grande pour l'ion cuivrique, ce qui aurait pour conséquence d'éloigner certains atomes coordinants du centre métallique. Cette idée va cependant à l'encontre des données bibliographiques qui précisent que l'augmentation de la taille du macrocycle, pour autant que l'on ne forme pas de cycle chélate à 7 membres, favorise la stabilisation des ions métalliques de petite taille comme le cuivre (II)⁷⁰⁷. La deuxième explication pourrait venir du fait que la version de SIBFA que nous avons utilisée ne permet pas de modéliser les effets dus au champ des ligands, et donc de prendre en compte certaines particularités géométriques typiques de l'ion cuivrique.

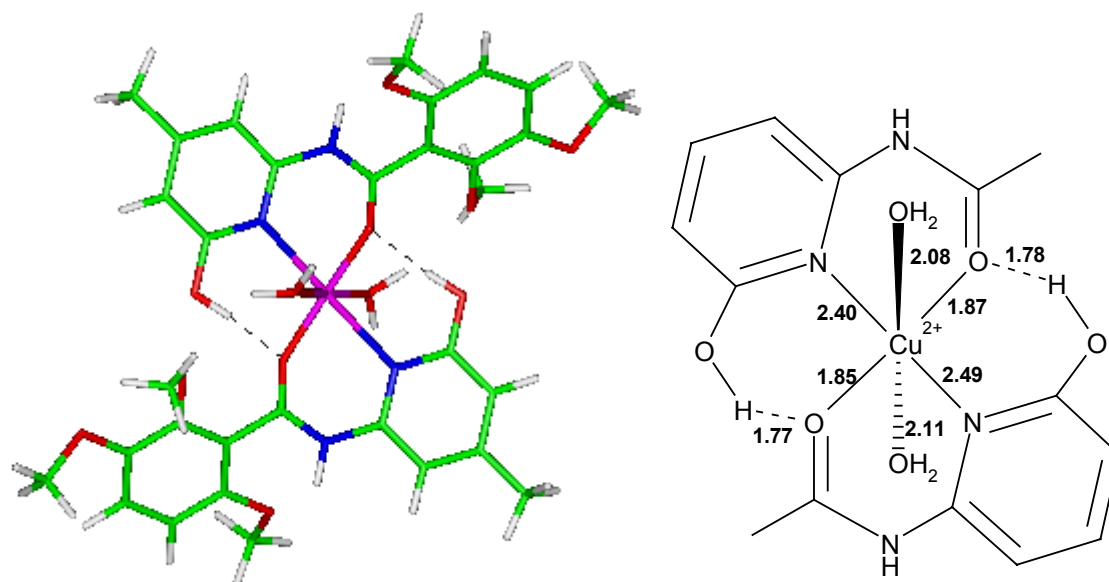


Figure 5. Structure du complexe **C1'** obtenue au terme de la minimisation par SIBFA. Les distances entre l'ion cuivrique et les atomes intervenant dans la coordination sont également reprises ainsi que celles des deux ponts H entre ligands. Code des couleurs : Cu : fushia, C : vert, O : rouge, N : bleu, H : blanc.

Malgré la perte d'interaction observée entre les azotes pyridiniques et le cuivre (II), l'énergie de stabilisation de **C1'** est, sans conteste, bien meilleure que celle de **C1**. On gagne, en effet, plus de 100 kcal/mol en mimant l'effet macrocyclique. Il est probable que cette différence soit surestimée, mais elle indique bien que cette légère modification structurale apporte une stabilisation indéniable au complexe. Les principales contributions énergétiques à ce phénomène de stabilisation par ponts hydrogène sont bien sur de nature électrostatique mais font également intervenir les termes de polarisation et de transfert de charge. Le terme répulsif, si important lorsque nous étudions l'influence des substituants méthoxy de **C1**, ne semble ici jouer aucun rôle.

Tableau 5. Energies d'interaction (kcal/mol) de **C1** et **C1'** après le processus de minimisation avec SIBFA. Les valeurs d' E_{solvCu} et d' $E_{\text{solvH}_2\text{O}}$, permettant de calculer le ΔE_{stab} , sont respectivement de -539.2 et de -3.9 kcal/mol. Les différentes contributions à l'énergie d'interaction intermoléculaire ont été obtenues en soustrayant à l'énergie des complexes deux fois celle de leur ligand respectif.

Complexes	C1	C1'
E_{MTP}	-397.3	-476.3
E_{rep}	120.2	120.9
E_{pol}	-126.2	-143.8
E_{ct}	-11.6	-16.0
E_{disp}	-46.3	-48.7
ΔE_{int}	-460.5	-563.5
E_{tor}	-11.3	-3.8
E_{solv}	-110.3	-115.4
ΔE_{stab}	-34.9	-135.7

Afin de nous assurer que **C1'** présentait les caractéristiques structurales permettant son interaction avec la protéase, nous avons inséré le complexe dans le site actif de l'enzyme, suivant l'orientation 1 qui, rappelons-le, était la plus favorable pour **C1** (voir page 162, dans le premier chapitre de résultats). Le complexe **C1'**/protéase a ensuite été soumis à une minimisation à l'aide du champ de forces ESFF.

Au terme de ce processus d'optimisation, on observe bien la formation des deux ponts H interligands attendus. Un autre pont intramoléculaire peut également être relevé entre l'oxygène d'une des deux fonctions hydroxyles et une molécule d'eau apicale. Les ponts hydrogène formés entre **C1** et la protéase (voir le tableau 1.19. du

premier chapitre des résultats) se retrouvent dans le complexe **C1'**/protéase à l'exception de celui existant entre une des molécules d'eau apicales et l'isoleucine 50 des flaps. A la place, on observe cependant une nouvelle interaction de cette molécule d'eau avec la glycine 149. Un pont hydrogène supplémentaire est en outre formé entre l'azote amidique d'un des deux ligands organiques et l'aspartate 125. Le détail de ces ponts hydrogène intra et intermoléculaires est repris dans le tableau 6. et peut être visualisé à la figure 6. Remarquons ici que ces ponts hydrogène impliquent tous des acides aminés de la protéase toujours conservés (Asp25/125, Arg108 et Gly149) parmi les différentes souches du virus⁹⁰. La formation d'interactions ciblant spécifiquement ce genre de résidus favoriserait ainsi cette nouvelle famille d'inhibiteurs face aux variantes mutantes de la protéase.

Tableau 6. Relevé des ponts hydrogène inter et intramoléculaires au sein du complexe **C1'**/protéase au terme de leur optimisation. La numérotation de **C1'** est calquée sur celle de **C1** (symétrie #1 : -x+2, -y+1, -z+1). La distance entre l'isoleucine 50 et la molécule d'eau apicale (en italique) est trop élevée pour considérer la persistance du pont H.

Inter- moléculaire	Asp 25 H(H ₂ O) 1.63 Å	Asp125 H(H ₂ O) 1.88 Å 1.71 Å NH(9) 1.73 Å	<i>Ile 50</i> <i>O(H₂O)^{#1}</i> <i>3.02 Å</i>	Gly 149 H(H ₂ O) ^{#1} 1.65 Å	Arg 108 O(20) ^{#1} 1.93 Å 1.89 Å
Intra- moléculaire	O(11) H(OH) ^{#1} 1.61 Å	O(11) ^{#1} H(OH) 1.72 Å	H(H ₂ O) ^{#1} O(OH) 1.84 Å		

On peut donc en conclure que **C1'** conserve les capacités d'interaction de **C1** avec la protéase, puisque de nombreux ponts hydrogène peuvent être relevés avec les résidus catalytiques mais aussi avec les résidus des flaps. Comme nos calculs réalisés à l'aide de la méthode SIBFA prévoient, en outre, une stabilité accrue de **C1'** par rapport à **C1**, il serait intéressant d'envisager la synthèse d'un tel dérivé afin d'en étudier les propriétés inhibitrices et de confronter ces résultats théoriques à l'expérience. Ce travail pourrait ainsi initier le développement d'une nouvelle génération de complexes métallo-organiques plus stables, donc plus à même d'inhiber compétitivement la protéase du VIH-1.

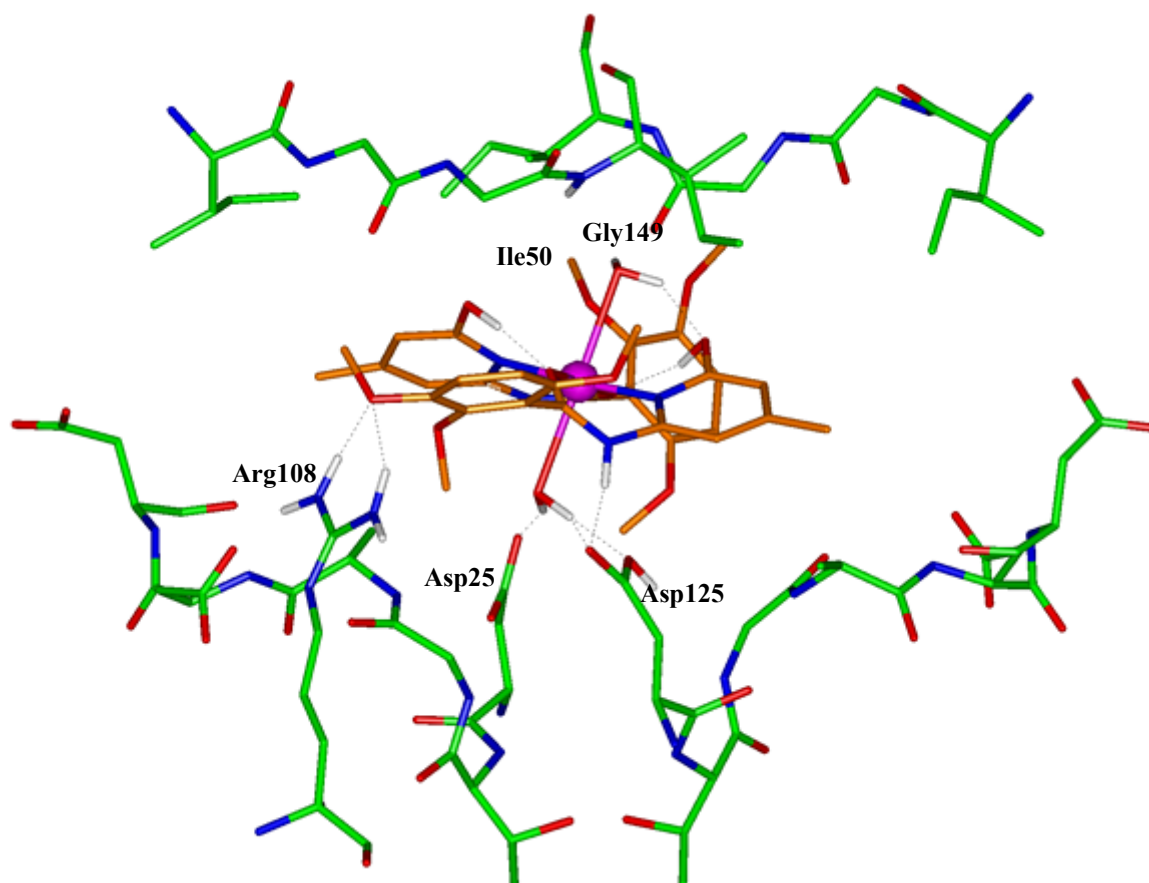


Figure 6. Interactions mises en jeu entre le complexe **C1'** et les résidus du site actif de la protéase. Les ponts H sont repris en pointillés. Code des couleurs : $C_{C1'}$: orange ; C_{PR} : vert ; N : bleu ; O : rouge ; H : blanc ; Cu : sphère fuchsia.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à plus long terme. On peut les classer suivant deux axes de recherche : le développement des inhibiteurs enzymatiques de type métallo-organique, et celui des méthodes théoriques permettant d'appréhender de tels systèmes.

La protéase du VIH-1 se prête bien à l'étude des potentialités des complexes métallo-organiques en tant qu'inhibiteurs enzymatiques. En effet, la protéase est extrêmement bien caractérisée, au point que différentes banques de données lui sont dédiées. Les différents éléments d'interaction existant au sein de son site actif, à savoir les principaux sous-sites ainsi que les molécules d'eau catalytique et structurale, s'organisent suivant une géométrie octaédrique, parfaitement reproduite par les complexes au cuivre (II). Cependant, la caractérisation de l'activité antiprotéolytique de tels complexes est délicate car les ions cuivriques libres ont, eux-mêmes, leur

propre action inhibitrice, en agissant hors du site actif au niveau des cystéines 67/167 et 95/195. Deux solutions peuvent être envisagées pour surmonter cette difficulté. La première consiste à n'étudier que des complexes suffisamment stables pour qu'aucun ion cuivrique perturbateur ne soit libéré dans le milieu, ce qui nous renvoie à la discussion précédente. La deuxième solution serait de se tourner vers les complexes d'un autre ion métallique, qui ne posséderait pas d'activité biologique propre. Il devrait cependant être apte à reproduire des géométries octaédriques, si possible déformées tétraгонаlement afin d'assurer la coordination à plus longue distance des molécules d'eau catalytiques et structurales*. Parmi les différentes possibilités, on peut citer le nickel (II), le cobalt (III), le fer (II) et (III), le cadmium (II), le manganèse (II), etc..., tout en gardant à l'esprit que le métal choisi devra former des complexes suffisamment stables avec ses ligands.

Une autre approche qui pourrait être envisagée est celle développée par Katz et ses collaborateurs^{557,558}. Ils ont montré que l'on pouvait concevoir un ligand organique spécifique d'un enzyme donné, capable d'interagir avec celui-ci *via* la complexation d'un ion métallique présent dans le milieu physiologique (voir également page 82 de l'introduction générale). Le zinc (II) est un inhibiteur modéré de la protéase du VIH-1. On pense qu'il agit en se liant aux aspartates catalytiques, suivant une géométrie tétraédrique, les deux coordinations restantes étant assurées par des molécules d'eau. Dès lors, on pourrait imaginer, suivant une procédure de conception rationnelle, un ligand organique bidentate non seulement capable de chélater le zinc naturellement présent dans le milieu physiologique, mais également apte à interagir avec les résidus des principaux sous-sites et des flaps.

Enfin, il reste à élucider le mode d'action des ions métalliques au niveau des cystéines 67/167 et 95/195 localisées respectivement en périphérie de l'enzyme et au sein de l'interface de dimérisation. Deux théories ont été avancées pour expliquer l'inhibition de la protéase par le cuivre (II). La première se base sur le pouvoir oxydant des ions cuivriques : en leur présence les cystéines seraient rapidement oxydées, formant ainsi des ponts disulfure intermoléculaires menant à des agrégats de protéines inactives⁴⁵¹. La seconde plaide plutôt pour la formation d'un complexe entre le cuivre (II), la cystéine 67 et l'histidine 69 : cette liaison provoquerait une déformation allostérique qui se répercuterait jusqu'aux flaps, interférant ainsi avec la liaison du

* La protéase possède heureusement une certaine flexibilité au niveau des flaps qui peuvent adopter des conformations plus ou moins fermées sur le site actif. On peut donc espérer qu'une géométrie octaédrique non déformée puisse, elle aussi, accommoder ces deux molécules d'eau cruciales moyennant un reploiement plus prononcé des flaps sur le site actif.

substrat dans le site actif^{454*}. Nous avons effectué quelques études préliminaires de dynamiques moléculaires pour explorer cette seconde piste : ces premières simulations nous ont permis de simuler des déformations allostériques susceptibles d'engendrer une déstructuration de l'enzyme et donc son inactivation. Certains ponts hydrogène stabilisant la structure de l'enzyme ont, par exemple, été mis en évidence. Leur rupture, au moyen d'inhibiteurs spécifiques, pourrait engendrer une déstructuration de la protéase au niveau des flaps, du site actif et de l'interface de dimérisation.

Le développement de méthodes théoriques permettant d'appréhender des systèmes comprenant des centres métalliques est également une voie de recherche prometteuse. Plusieurs travaux pourraient être envisagés à court ou à long terme pour poursuivre le développement et la validation de la méthode SIBFA. L'évaluation par SIBFA de l'énergie de stabilisation de diverses séries de complexes, dont les constantes de stabilité ont été déterminées expérimentalement, devrait confirmer la méthodologie que nous avons suivie pour étudier et prédire les stabilités relatives des composés étudiés lors de cette thèse. Ce travail permettrait en outre de fournir une échelle de référence à laquelle on pourrait se rapporter lors d'études prédictives.

Comme nous l'avons expliqué dans le dernier chapitre des résultats, la version de SIBFA que nous avons utilisée ici souffre d'une limitation importante : elle ne prend pas en compte les effets du champ des ligands. Par conséquent, seuls les complexes présentant une géométrie octaédrique ont pu être étudiés dans le cadre de cette thèse, en négligeant les conséquences structurales et énergétiques de l'effet Jahn-Teller. A l'heure actuelle, une nouvelle version optimisée, appelée SIBFA-LF, est disponible⁶⁵⁷. Elle devrait permettre, non seulement d'étudier la stabilité relative de chaque complexe, mais également de caractériser l'importance pour ces composés de la stabilisation due à l'effet Jahn-Teller.

Enfin, il serait intéressant d'appliquer SIBFA pour simuler l'interaction entre les résidus du site actif de la protéase, les molécules d'eau catalytiques et structurales, l'ion cuivrique et les ligands organiques s'insérant dans les différents sous-sites. Cela permettrait d'appuyer et d'affiner les résultats que nous avons obtenus en mécanique moléculaire classique.

* Ces hypothèses et les arguments sur lesquels elles s'appuient sont expliqués en détail aux pages 63, 64 et 65 de l'introduction générale.

- [1] "Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men in New York and California." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **1981**. 30: pp. 305-308.
- [2] "Pneumocystis pneumonia-Los Angeles." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **1981**. 30: pp. 250-252.
- [3] Rozenbaum, W., *La vie est une maladie sexuellement transmissible constamment mortelle*, ed. Stock. **1999**, Paris.
- [4] Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L., "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science*, **1983**. 220: pp. 868-871.
- [5] Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M., "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science*, **1983**. 220(4599): pp. 865-7.
- [6] Whittle, H., Morris, J., Todd, J., Corrah, T., Sabally, S., Bangali, J., Ngom, P.T., Rolfe, M., and Wilkins, A., "HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients." *Aids*, **1994**. 8(11): pp. 1617-20.
- [7] Hooper, E., "Sailors and star-bursts, and the arrival of HIV." *BMJ*, **1997**. 315(7123): pp. 1689-91.
- [8] Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D., "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators [see comments]." *New Engl J Med*, **1998**. 338(13): pp. 853-60.
- [9] Bartlett, J. and Moore, R., "L'amélioration des traitements contre le VIH." *Pour la Science*, **1998**. 251: pp. 30-39.
- [10] 2004: *Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA. 4e rapport annuel*, ONUSIDA, <http://www.unaids.org/en/default.asp>
- [11] Hamers, F.F. and Downs, A.M., "The changing face of the HIV epidemic in western Europe: what are the implications for public health policies?" *Lancet*, **2004**. 364(9428): pp. 83-94.
- [12] "HIV/AIDS: not one epidemic but many." *Lancet*, **2004**. 364(9428): pp. 1-2.
- [13] Clark, S., "Experts predict global devastation due to HIV/AIDS." *Lancet*, **2002**. 360: p. 145.
- [14] Pincock, S., "Experts warn of AIDS threat to eastern Europe." *Lancet*, **2004**. 363(9410): p. 712.
- [15] Ruxrungtham, K., Brown, T., and Phanuphak, P., "HIV/AIDS in Asia." *Lancet*, **2004**. 364(9428): pp. 69-82.
- [16] De Cock, K.M. and Janssen, R.S., "An unequal epidemic in an unequal world." *Jama*, **2002**. 288(2): pp. 236-8.
- [17] Asamoah-Odei, E., Garcia Calleja, J.M., and Boerma, J.T., "HIV prevalence and trends in sub-Saharan Africa: no decline and large subregional differences." *Lancet*, **2004**. 364(9428): pp. 35-40.

- [18] Buve, A., Bishikwabo-Nsarhaza, K., and Mutangadura, G., "The spread and effect of HIV-1 infection in sub-Saharan Africa." *Lancet*, **2002**. 359(9322): pp. 2011-7.
- [19] Piot, P., Bartos, M., Ghys, P.D., Walker, N., and Swartzlander, B., "The global impact of HIV/AIDS." *Nature*, **2001**. 410(6831): pp. 968-73.
- [20] Piot, P., Zewdie, D., and Turmen, T., "HIV/AIDS prevention and treatment." *Lancet*, **2002**. 360(9326): pp. 86.
- [21] Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C., "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1980**. 77(12): pp. 7415-9.
- [22] White, D.O. and Fenner, F.J., *Medical Virology*. fourth ed. **1994**, San diego California: academic press inc.
- [23] Leonard, R., Zagury, D., Desportes, I., and Bernard, J., "Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of infection." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**. 85(10): pp. 3570-3574.
- [24] Alimonti, J.B., Ball, T.B., and Fowke, K.R., "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." *J Gen Virol*, **2003**. 84: pp. 1649-1661.
- [25] Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W., "Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity." *Nature*, **1986**. 322: pp. 470-474.
- [26] Fauci, A.S., "The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis." *Science*, **1988**. 239: pp. 617-622.
- [27] Fauci, A.S. and Desrosiers, R.C., *Pathogenesis of HIV and SIV*, in *Retroviruses*. **1997**. pp. 587-635.
- [28] Wilk, T. and Fuller, S.D., "Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer." *Curr Opin Struct Biol*, **1999**. 9(2): pp. 231-43.
- [29] Muesing, M.A., Smith, D.H., Cabradilla, C.D., Benton, C.V., Lasky, L.A., and Capon, D.J., "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus." *Nature*, **1985**. 313: pp. 450-458.
- [30] Ratner, R., "HIV life cycle and genetic approaches." *PD3*, **1993**. 1(1): pp. 3-22.
- [31] Frankel, A.D. and Young, J.A., "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annu Rev Biochem*, **1998**. 67: pp. 1-25.
- [32] LaBranche, C.C., Galasso, G., Moore, J.P., Bolognesi, D.P., Hirsch, M.S., and Hammer, S.M., "HIV fusion and its inhibition." *Antiviral Res*, **2001**. 50(2): pp. 95-115.
- [33] Miller, M.D., Farnet, C.M., and Bushman, F.D., "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." *J Virol*, **1997**. 71(7): pp. 5382-90.
- [34] Tasara, T., Maga, G., Hottiger, M.O., and Hübscher, U., "HIV-1 reverse transcriptase and integrase enzymes physically interact and inhibit each other." *FEBS Lett*, **2001**. 507(1): pp. 39-44.
- [35] Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L., and Harrison, S.C., "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance." *Science*, **1998**. 282(5394): pp. 1669-75.

- [36] Li, X., Quan, Y., Arts, E.J., Li, Z., Preston, B.D., de Rocquigny, H., Roques, B.P., Darlix, J.L., Kleiman, L., Parniak, M.A., and Wainberg, M.A., "Human immunodeficiency virus Type 1 nucleocapsid protein (NCp7) directs specific initiation of minus-strand DNA synthesis primed by human tRNA(Lys3) in vitro: studies of viral RNA molecules mutated in regions that flank the primer binding site." *J Virol*, **1996**. 70(8): pp. 4996-5004.
- [37] Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watts, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H., "DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection." *Cell*, **2003**. 113: pp. 803-809.
- [38] Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A.J., "Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein." *Science*, **2003**. 300: p. 1112.
- [39] Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.-F., "Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex." *Science*, **2003**. 302(5647): pp. 1056-1060.
- [40] Liddament, M.T., Brown, W.L., Schumacher, A.J., and Harris, R.S., "APOBEC3F Properties and Hypermutation Preferences Indicate Activity against HIV-1 In Vivo." *Curr Biol*, **2004**. 14(15): pp. 1385-1391.
- [41] Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.-J., and Malim, M.H., "Cytidine Deamination of Retroviral DNA by Diverse APOBEC Proteins." *Curr Biol*, **2004**. 14(15): pp. 1392-1396.
- [42] Conticello, S.G., Harris, R.S., and Neuberger, M.S., "The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G." *Curr Biol*, **2003**. 13(22): pp. 2009-2013.
- [43] Miller, R.J., Cairns, J.S., Bridges, S., and Sarver, N., "Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses." *J Virol*, **2000**. 74(16): pp. 7187-95.
- [44] McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J., "Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells." *J Cell Biol*, **2002**. 159(3): pp. 441-452.
- [45] Haffar, O.K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S.G., and Bukrinsky, M., "Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." *J Mol Biol*, **2000**. 299(2): pp. 359-68.
- [46] Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D., "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**. 94(18): pp. 9825-30.
- [47] Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G., and Bukrinsky, M., "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." *Embo J*, **1998**. 17(4): pp. 909-17.
- [48] Hurt, E.C., "Importins/karyopherins meet nucleoporins." *Cell*, **1996**. 84(4): pp. 509-15.
- [49] Craigie, R., "HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics." *J Biol Chem*, **2001**. 276(26): pp. 23213-6.
- [50] Carteau, S., Batson, S.C., Poljak, L., Mouscadet, J.F., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Roques, B.P., Kas, E., and Auclair, C., "Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein specifically stimulates Mg²⁺-dependent DNA integration in vitro." *J Virol*, **1997**. 71(8): pp. 6225-9.

- [51] Cullen, B.R., "HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell." *Cell*, **1998**. 93(5): pp. 685-92.
- [52] Matzen, K., Dirkx, A.E.M., oude Egbrink, M.G.A., Speth, C., Götte, M., Ascherl, G., Grimm, T., Griffioen, A.W., and Stürzl, M., "HIV-1 Tat increases the adhesion of monocytes and T-cells to the endothelium in vitro and in vivo: implications for AIDS-associated vasculopathy." *Virus Res*, **2004**. 104(2): pp. 145-155.
- [53] Joseph, A.M., Ladha, J.S., Mojamdar, M., and Mitra, D., "Human immunodeficiency virus-1 Nef protein interacts with Tat and enhances HIV-1 gene expression." *FEBS Lett*, **2003**. 548(1-3): pp. 37-42.
- [54] Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M., and Sundquist, W.I., "Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**. 93(7): pp. 3099-104.
- [55] Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C., and Lingappa, J.R., "Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids." *Nature*, **2002**. 415(6867): pp. 88-92.
- [56] Montal, M., "Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1." *FEBS Lett*, **2003**. 552(1): pp. 47-53.
- [57] Fischer, W.B., "Vpu from HIV-1 on an atomic scale: experiments and computer simulations." *FEBS Lett*, **2003**. 552(1): pp. 39-46.
- [58] Gonzalez, M.E. and Carrasco, L., "Viroporins." *FEBS Lett*, **2003**. 552(1): pp. 28-34.
- [59] Fauré, J., Stalder, R., Borel, C., Sobo, K., Piguet, V., Demareux, N., Gruenberg, J., and Trono, D., "ARF1 Regulates Nef-Induced CD4 Degradation." *Curr Biol*, **2004**. 14(12): pp. 1056-1064.
- [60] Bampi, C., Jacquenet, S., Lener, D., Décimo, D., and Darlix, J.L., "The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance." *Int J Biochem and Cell Biol*, **2004**. 36(9): pp. 1668-1686.
- [61] Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Krausslich, H.G., and Yewdell, J.W., "Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**. 97(24): pp. 13057-62.
- [62] Moulard, M. and Decroly, E., "Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases." *Biochim Biophys Acta*, **2000**. 1469(3): pp. 121-32.
- [63] Sluis-Cremer, N., Arion, D., Abram, M.E., and Parniak, M.A., "Proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor: insights into the mechanism of reverse transcriptase p66/p51 heterodimer formation." *Int J Biochem and Cell Biol*, **2004**. 36(9): pp. 1836-1847.
- [64] Barrie, K.A., Perez, E.E., Lamers, S.L., Farmerie, W.G., Dunn, B.M., Sleasman, J.W., and Goodenow, M.M., "Natural variation in HIV-1 protease, gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1." *Virology*, **1996**. 219: pp. 407-416.
- [65] Xiang, Y., Ridky, T.W., Krishna, N.K., and Leis, J., "Altered Rous Sarcoma virus gag polyprotein processing and its effect on particle formation." *J. Virol.*, **1997**. 71(3): pp. 2083-2091.

- [66] Zybarth, G. and Carter, C., "Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing." *J Virol*, **1995**. 69(6): pp. 3878-3884.
- [67] De Clercq, E., "New developments in anti-HIV chemotherapy." *Biochim Biophys Acta*, **2002**. 1587(2-3): pp. 258-75.
- [68] De Clercq, E., "HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches." *Int J Biochem and Cell Biol*, **2004**. 36(9): pp. 1800-1822.
- [69] Esté, J.A., "Virus entry as a target for anti-HIV infection." *Curr Med Chem*, **2003**. 10: pp. 1617-1632.
- [70] Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., St Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., and Broder, S., "3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1985**. 82(20): pp. 7096-100.
- [71] Parniak, M.A. and Sluis-Cremer, N., *Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase*, in *HIV-1, molecular biology and pathogenesis*. **2000**, Academic press. pp. 67-109.
- [72] De Clercq, E., "Towards improved Anti-HIV Chemotherapy: Therapeutic Strategies for intervention with HIV Infections." *J Med Chem*, **1995**. 38(14): pp. 2491-2517.
- [73] Rezende, L.F. and Prasad, V.R., "Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates." *Int J Biochem and Cell Biol*, **2004**. 36(9): pp.1716-1725.
- [74] Pommier, Y., Marchand, C., and Neamati, N., "Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives." *Antiviral Res*, **2000**. 47(3): pp. 139-48.
- [75] Witvrouw, M., Van Maele, B., Vercammen, J., Hantson, A., Engelborghs, Y., De Clercq, E., Pannecouque, C., and Debyser, Z., "Novel inhibitors of HIV-1 integration." *Curr Drug Metabol*, **2004**. 5(4): pp. 291-304.
- [76] Druillenec, S. and Roques, B.P., "HIV-1 NCp7 as a target for the design of novel antiviral agents." *Drug New Perspect*, **2000**. 13(6): pp. 337-349.
- [77] Letvin, N.L., Barouch, D.H., and Montefiori, D.C., "Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS." *Annu Rev Immunol*, **2002**. 20: pp. 73-99.
- [78] Mooij, P. and Heeney, J.L., "Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins." *Vaccine*, **2002**. 20: pp 304-321.
- [79] Nabel, G.J., "Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine." *Nature*, **2001**. 410(6831): pp. 1002-7.
- [80] Baltimore, D. and Heilman, C., "Les vaccins contre le SIDA: espoirs et défis." *Pour la Science*, **1998**. 251: pp. 44-50.
- [81] Cao, H., Kaleebu, P., Hom, D., Flores, J., Agrawal, D., Jones, N., Serwanga, J., Okello, M., Walker, C., Sheppard, H., El-Habib, R., Klein, M., Mbidde, E., Mugenyi, P., Walker, B., Ellner, J., and Mugerwa, R., "Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of the HIV network for prevention trials 007 vaccine study." *J Infect Dis*, **2003**. 187(6): pp. 887-895.

- [82] Louie, M. and Markowitz, M., "Goals and milestones during treatment of HIV-1 infection with antiretroviral therapy: a pathogenesis-based perspective." *Antiviral Res*, **2002**. 55(1): pp. 15-25.
- [83] Gallant, J.E., "Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection." *Jama*, **2000**. 283(10): pp. 1329-34.
- [84] Vella, S. and Palmisano, L., "Antiretroviral therapy: state of the HAART." *Antiviral Res*, **2000**. 45(1): pp. 1-7.
- [85] Richman, D.D., "HIV chemotherapy." *Nature*, **2001**. 410(6831): pp. 995-1001.
- [86] Telenti, A. and Paolo Rizzardì, G., "Limits to potent antiretroviral therapy." *Rev Med Virol*, **2000**. 10(6): pp. 385-93.
- [87] Larder, B., "Mechanisms of HIV-1 drug resistance." *Aids*, **2001**. 15(Suppl 5): pp. S27-34.
- [88] Paolucci, S., Baldanti, F., Maserati, R., Castelli, F., Suter, F., Maggiolo, F., Pan, A., and Gerna, G., "Quantification of the impact of HIV-1 reverse transcriptase and protease mutations on the efficacy of rescue HAART." *Antiviral Res*, **2000**. 45(2): pp. 101-14.
- [89] Rousseau, M.N., Vergne, L., Montes, B., Peeters, M., Reynes, J., Delaporte, E., and Segondy, M., "Patterns of resistance mutations to antiretroviral drugs in extensively treated HIV-1-infected patients with failure of highly active antiretroviral therapy." *J Acquir Immune Defic Syndr*, **2001**. 26(1): pp. 36-43.
- [90] Ohtaka, H., Muzammil, S., Schön, A., Velazquez-Campoy, A., Vega, S., and Freire, E., "Thermodynamic rules for the design of high affinity HIV-1 protease inhibitors with adaptability to mutations and high selectivity towards unwanted targets." *Int J Biochem and Cell Biol*, **2004**. 36(9): pp. 1787-1799.
- [91] d'Arminio Monforte, A., Lepri, A.C., Rezza, G., Pezzotti, P., Antinori, A., Phillips, A.N., Angarano, G., Colangeli, V., De Luca, A., Ippolito, G., Caggese, L., Soscia, F., Filice, G., Gritti, F., Narciso, P., Tirelli, U., and Moroni, M., "Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I.CO.N.A. Study Group. Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients." *Aids*, **2000**. 14(5): pp. 499-507.
- [92] Jain, R.G., Furfine, E.S., Pedneault, L., White, A.J., and Lenhard, J.M., "Metabolic complications associated with antiretroviral therapy." *Antiviral Res*, **2001**. 51(3): pp. 151-77.
- [93] Wutzler, P. and Thust, R., "Genetic risks of antiviral nucleoside analogues--a survey." *Antiviral Res*, **2001**. 49(2): pp. 55-74.
- [94] Pierson, T., McArthur, J., and Siliciano, R.F., "Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy." *Annu Rev Immunol*, **2000**. 18: pp. 665-708.
- [95] Aquaro, S., Calio, R., Balzarini, J., Bellocchi, C., Garaci, E., and Perno, C.F., "Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir." *Antiviral Res*, **2002**. 55: pp. 209-225.
- [96] Craik, C.S. and Debouck, C., "Proteases as therapeutic targets." *PD3*, **1995**. 2(3): pp. 327-328.
- [97] Roose, J.P. and Vannoorden, C.J.F., "Synthetic protease inhibitors: Promising compounds to arrest pathobiologic processes." *J Lab Clin Med*, **1995**. 125(4): pp. 433-441.

- [98] Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F., *Handbook of proteolytic enzymes*. **1998**, San Diego, London: Academic Press.
- [99] Toh, H., Ono, M., Saigo, K., and Miyata, T., "Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1." *Nature*, **1985**. 315: pp. 691.
- [100] Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S., "Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**. 85(13): pp. 4686-90.
- [101] Seelmeier, S., Schmidt, H., Turk, V., and von der Helm, K., "Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**. 85: pp. 6612-6616.
- [102] Loeb, D.D., Swanstrom, R., Everitt, L., Manchester, M., Stamper, S.E., and Hutchison, C.A., "Complete mutagenesis of the HIV-1 protease." *Nature*, **1989**. 340: pp. 397-400.
- [103] Meek, T.D., Dayton, B.D., Metcalf, B.W., Dreyer, G.B., Strickler, J.E., Gorniak, J.G., Rosenberg, M., Moore, M.L., Magaard, V.W., and Debouck, C., "Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in Escherichia Coli behaves as a dimeric aspartic protease." *Biochemistry*, **1989**. 86: pp. 1841-1845.
- [104] Guruprasad, K., Dhanaraj, V., Groves, M., and Blundell, T.L., "Aspartic proteinases : The structures and functions of a very versatile superfamily of enzymes." *PD3*, **1995**. 2(3): pp. 329-341.
- [105] Gustchina, A. and Weber, I.T., "Comparison of inhibitor binding in HIV-1 protease and in non-viral aspartic protease: the role of the flap." *FEBS Lett.*, **1990**. 269(1): pp. 269-272.
- [106] Wlodawer, A. and Gustchina, A., "Structural and biochemical studies of retroviral proteases." *Biochim Biophys Acta*, **2000**. 1477(1-2): pp. 16-34.
- [107] Davies, D.R., "The structure and function of the aspartic proteinases." *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **1990**. 19: pp. 189-215.
- [108] Scott, W.R. and Schiffer, C.A., "Curling of flap tips in HIV-1 protease as a mechanism for substrate entry and tolerance of drug resistance." *Structure Fold Des*, **2000**. 8(12): pp. 1259-65.
- [109] Tang, J., James, M.N., Hsu, I.N., Jenkins, J.A., and Blundell, T.L., "Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases." *Nature*, **1978**. 271(5646): pp. 618-21.
- [110] Blundell, T.L. and Srinivasan, N., "Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**. 93(25): pp. 14243-8.
- [111] Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J., and Kent, S.B.H., "Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease." *Science*, **1989**. 245: pp. 616-621.
- [112] Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L., and Springer, J.P., "Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1." *Nature*, **1989**. 337(16): pp. 615.
- [113] Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J.R., Whittle, P.J., Danley, D.E., Geoghegan, K.F., Hawrylik, S.J., Lee, S.E., Scheld, K.G., and Hobart, P.M., "X-Ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes." *Nature*, **1989**. 342: pp. 299-302.

- [114] Ishima, R., Torchia, D.A., Lynch, S.M., Gronenborn, A.M., and Louis, J.M., "Solution structure of the mature HIV-1 protease monomer: insight into the tertiary fold and stability of a precursor." *J Biol Chem*, **2003**. 278: pp. 43311 - 43319.
- [115] Todd, M.J., Semo, N., and Freire, E., "The structural stability of the HIV-1 protease." *J Mol Biol*, **1998**. 283(2): pp. 475-488.
- [116] Ishima, R., Ghirlando, R., Tozser, J., Gronenborn, A.M., Torchia, D.A., and Louis, J.M., "Folded monomer of HIV-1 protease." *J Biol Chem*, **2001**. 276(52): pp. 49110-6.
- [117] Louis, J.M., Ishima, R., Nesheiwat, I., Pannell, L.K., Lynch, S.M., Torchia, D.A., and Gronenborn, A.M., "Revisiting monomeric HIV-1 protease. Characterization and redesign for improved properties." *J Biol Chem*, **2003**. 278(8): pp. 6085-92.
- [118] Harte, W.E.J. and Beveridge, D.L., "Mechanism for the destabilization of the dimer interface in a mutant HIV-1 protease : a molecular dynamics study." *J Am Chem Soc*, **1993**. 115: pp. 1231-1234.
- [119] Schechter, I. and Berger, A., "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun*, **1967**. 27(2): pp. 157-162.
- [120] Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E., and Schiffer, C.A., "Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes." *Structure*, **2002**. 10(3): pp. 369-81.
- [121] Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E., and Schiffer, C.A., "How does a symmetric dimer recognize an asymmetric substrate? A substrate complex of HIV-1 protease." *J Mol Biol*, **2000**. 301(5): pp. 1207-20.
- [122] Nicholson, L.K., Yamazaki, T., Torchia, D.A., Grzesiek, S., Bax, A., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Wingfield, P.T., Lam, P.Y., Jadhav, P.K., and et al., "Flexibility and function in HIV-1 protease." *Nat Struct Biol*, **1995**. 2(4): pp. 274-80.
- [123] Ishima, R., Freedberg, D.I., Wang, Y.X., Louis, J.M., and Torchia, D.A., "Flap opening and dimer-interface flexibility in the free and inhibitor- bound HIV protease, and their implications for function." *Structure Fold Des*, **1999**. 7(9): pp. 1047-55.
- [124] Furfine, E.S., D'Souza, E., Ingold, K.J., Leban, J.J., Spector, T., and Porter, D.J., "Two-step binding mechanism for HIV protease inhibitors." *Biochemistry*, **1992**. 31(34): pp. 7886-91.
- [125] Rodriguez, E.J., Debouck, C., Deckman, I.C., Abu-Soud, H., Raushel, F.M., and Meek, T.D., "Inhibitor binding to the Phe53Trp mutant of HIV-1 protease promotes conformational changes detectable by spectrofluorometry." *Biochemistry*, **1993**. 32(14): pp. 3557-63.
- [126] Harte, W.E., Swaminathan, S., Mansuri, M.M., Martin, J.C., Rosenberg, I.E., and Beveridge, D.L., "Domain communication in the dynamical structure of human immunodeficiency virus 1 protease." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**. 87: pp. 8864-8868.
- [127] Collins, J.R., Burt, S.K., and Erickson, J.W., "Flap opening in HIV-1 protease simulated by 'activated' molecular dynamics." *Nat Struct Biol*, **1995**. 2(4): pp. 334-8.
- [128] Spinelli, S., Liu, Q.Z., Alzari, P.M., Hirel, P.H., and Poljak, R.J., "The three-dimensional structure of the aspartyl protease from the HIV-1 isolate BRU." *Biochimie*, **1991**. 73(11): pp. 1391-6.
- [129] Baca, M. and Kent, S.B.H., "Catalytic contribution of flap-substrate hydrogen bonds in "HIV-1 protease" explored by chemical synthesis." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1993**. 90: pp. 11638-11642.

- [130] Suguna, K., Padlan, E.A., Smith, C.W., Carlson, W.D., and Davies, D.R., "Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**. 84: pp. 7009-7013.
- [131] Beveridge, A., "A Theoretical Study of Torsional Flexibility in the Active Site of Aspartic Proteinases : Implication for Catalysis." *Proteins Struct Funct Gen*, **1996**. 24: pp. 322-334.
- [132] Venturini, A., Lopez-Ortiz, F., Alvarez, J.M., and Gonzalez, J., "Theoretical Proposal of a Catalytic Mechanism for the HIV-1 Protease Involving an Enzyme-Bound Tetrahedral Intermediate." *J Am Chem Soc*, **1998**. 120: pp. 1110-1111.
- [133] Park, H., Suh, J., and Lee, S., "Ab initio studies on the catalytic mechanism of aspartic proteinases: nucleophilic versus general acid/ general base mechanism." *J Am Chem Soc*, **2000**. 122: pp. 3901-3908.
- [134] Chatfield, D.C. and Brooks, B.R., "HIV-1 protease cleavage mechanism elucidated with molecular dynamics simulation." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117(20): pp. 5561-5572.
- [135] Chatfield, D.C., Eurenus, K.P., and Brooks, B.R., "HIV-1 protease cleavage mechanism : a theoretical investigation based on a classical MD simulation and reaction path calculations using a hybrid QM/MM potential." *J Mol Struct*, **1998**. 423: pp. 79-92.
- [136] Trylska, J., Bala, P., Geller, M., and Grochowski, P., "Molecular Dynamics Simulations of the First Steps of the Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease." *Biophys J*, **2002**. 83(2): pp. 794-807.
- [137] Piana, S. and Carloni, P., "Conformational flexibility of the catalytic Asp dyad in HIV-1 protease: An ab initio study on the free enzyme." *Proteins*, **2000**. 39(1): pp. 26-36.
- [138] Piana, S., Carloni, P., and Parrinello, M., "Role of conformational fluctuations in the enzymatic reaction of HIV-1 protease." *J Mol Biol*, **2002**. 319(2): pp. 567-83.
- [139] Liu, H., Muller-Plathe, F., and van Gunsteren, W.F., "A combined quantum/classical molecular dynamics study of the catalytic mechanism of HIV protease." *J Mol Biol*, **1996**. 261(3): pp. 454-69.
- [140] Jaskolski, M., Tomasselli, A.G., Sawyer, T.K., Staples, D.G., Heinrikson, R.L., Schneider, J., Kent, B.H., and Wlodawer, A., "Structure at 2,5-Å resolution of chemically synthesized human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor." *Biochemistry*, **1991**. 30: pp. 1600-1609.
- [141] Silva, A.M., Cachau, R.E., Sham, H.L., and Erickson, J.W., "Inhibition and catalytic mechanism of HIV-1 aspartic protease." *J Mol Biol*, **1996**. 255(2): pp. 321-340.
- [142] Hyland, L.J., Tomaszek, T.A., Jr., Roberts, G.D., Carr, S.A., Magaard, V.W., Bryan, H.L., Fakhoury, S.A., Moore, M.L., Minnich, M.D., Culp, J.S., *et al.* "Human immunodeficiency virus-1 protease. 1. Initial velocity studies and kinetic characterization of reaction intermediates by ¹⁸O isotope exchange." *Biochemistry*, **1991**. 30(34): pp. 8441-53.
- [143] Slee, D.H., Laslo, K.L., Elder, J.H., Ollmann, I.R., Gustchina, A., Kervinen, J., Zdanov, A., Wlodawer, A., and Wong, C.H., "Selectivity in the Inhibition of HIV and FIV Protease: Inhibitory and Mechanistic Studies of Pyrrolidine-Containing α -Keto Amide and Hydroxyethylamine Core Structures." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117: pp. 11867 - 11878.
- [144] Wang, Y.X., Freedberg, D.I., Yamazaki, T., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Kiso, Y., and Torchia, D.A., "Solution NMR evidence that the HIV-1 protease catalytic aspartyl groups have

different ionization states in the complex formed with the asymmetric drug KNI-272." *Biochemistry*, **1996**. 35(31): pp. 9945-9950.

[145] Yamazaki, T., Hinck, A.P., Wang, Y.X., Nicholson, L.K., Torchia, D.A., Wingfield, P., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Chang, C.H., Domaille, P.J., and Lam, P.Y.S., "Three-dimensional solution structure of the HIV-1 protease complexed with DMP323, a novel cyclic urea-type inhibitor, determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Protein Sci.*, **1996**. 5(3): pp. 495-506.

[146] Brik, A. and Wong, C.H., "HIV-1 protease: mechanism and drug discovery." *Org Biomol Chem*, **2003**. 1: pp. 5-14.

[147] Krausslich, H.G., "Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**. 88(8): pp. 3213-7.

[148] Paulus, C., Hellebrand, S., Tessmer, U., Wolf, H., Krausslich, H.G., and Wagner, R., "Competitive inhibition of human immunodeficiency virus type-1 protease by the Gag-Pol transframe protein." *J Biol Chem*, **1999**. 274(31): pp. 21539-43.

[149] Bhavesh, N.S., Sinha, R., Mohan, P.M.K., and Hosur, R.V., "NMR Elucidation of Early Folding Hierarchy in HIV-1 Protease." *J Biol Chem*, **2003**. 278: pp. 19980 - 19985.

[150] Wang, C.T., Chou, Y.C., and Chiang, C.C., "Assembly and processing of human immunodeficiency virus Gag mutants containing a partial replacement of the matrix domain by the viral protease domain." *J Virol*, **2000**. 74(7): pp. 3418-22.

[151] Wondrak, E.M., Nashed, N.T., Haber, M.T., Jerina, D.M., and Louis, J.M., "A transient precursor of the HIV-1 protease. Isolation, characterization, and kinetics of maturation." *J Biol Chem*, **1996**. 271(8): pp. 4477-81.

[152] Louis, J.M., Wondrak, E.M., Kimmel, A.R., Wingfield, P.T., and Nashed, N.T., "Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism." *J Biol Chem*, **1999**. 274(33): pp. 23437-42.

[153] Tessmer, U. and Krausslich, H.G., "Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N- terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity." *J Virol*, **1998**. 72(4): pp. 3459-63.

[154] Dixon, M., Webb, E.C., Thorne, C.J.R., and Tipton, K.F., *Enzymes*. 3rd ed, ed. Ldt, L.G. **1979**, London: Academic Press.

[155] Kramer, R.A., Schaber, M.D., Skalka, A.M., Ganguly, K., Wong-Staal, F., and Reddy, E.P., "HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol- protease." *Science*, **1986**. 231(4745): pp. 1580-4.

[156] Pauling, L., "Molecular achitecture and biological reactions" *Chem Eng News*, **1946**. 24: pp. 1375-77.

[157] McKeever, B.M., Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., Springer, J.P., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., and Darke, P.L., "Crystallisation of the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus, HIV-1." *J Biol Chem*, **1989**. 264(4): pp. 1919-1921.

[158] Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B.K., Toth, M.V., Marshall, G.R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S.B.H., and Wlodawer, A., "Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution." *Science*, **1989**. 246: p. 1149.

- [159] Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J.K.M., Leis, J., and Wlodawer, A., "Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family." *Nature*, **1989**. 337: pp. 576-579.
- [160] Wlodawer, A., Miller, M., Swain, A.L., and Jaskolski, M., *Structures of three inhibitor complexes of HIV-1 protease*, in *Methods in Protein Sequence Analysis*, Jornvall, Hoog, and Gustavsson, Editors. **1991**, Birhauser Verlag: Basel. pp. 215-221.
- [161] Wlodawer, A., Swain, A.L., and Gustchina, A., *Comparison of crystal structures of inhibitor complexes of the human immunodeficiency virus protease*, in *Molecular Aspects of Chemotherapy*, Shugar, D., Rode, W., and Borowski, E., Editors. **1991**, Springer-Verlag, Polish Scientific Publishers PWN: Warszawa. pp. 173-186.
- [162] Marshall, G.R., "A hierarchical approach to peptidomimetics design." *Tetrahedron*, **1993**. 49(17): pp. 3547-3558.
- [163] Gante, J., "Peptidomimetics - Tailored enzyme inhibitors." *Angew Chem Int Ed Engl*, **1994**. 33(17): pp. 1699-1720.
- [164] Mills, J.S., "Virus proteinase inhibitors-what next after HIV." *Antivir Chem Chemother*, **1996**. 7(6): pp. 281-293.
- [165] Nutt, R.F., Brady, S.F., Darke, P.L., Ciccarone, T.M., Colton, C.D., Nutt, E.M., Rodkey, J.A., Bennett, C.D., Waxman, L.H., Sigal, I.S., Anderson, P.S., and Veber, D.F., "Chemical synthesis and enzymatic activity of 99-residue peptide with a sequence proposed for the human immunodeficiency virus protease." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**. 85: pp. 7129-7133.
- [166] Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., VanMiddlesworth, J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Leu, C.T., Herber, W.K., Dixon, R.A.F., and Darke, P.L., "Crystallographic analysis of a complex between immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0 Å resolution." *J Biol Chem*, **1990**. 265(24): pp. 14209.
- [167] Sakurai, M., Sugano, M., Handa, H., Komai, T., Yagi, R., Nishigaki, T., and Yabe, Y., "Studies of HIV-1 protease inhibitors. I. Incorporation of a reduced peptide, simple aminoalcohol, and statine analog at the scissile site of substrate sequences." *Chem Pharm Bull*, **1993**. 41(8): pp. 1369-1377.
- [168] Skalova, T., Hasek, J., Dohnalek, J., Petrokova, H., Buchtelova, E., Duskova, J., Soucek, M., Majer, P., Uhlikova, T., and Konvalinka, J., "An ethylenamine inhibitor binds tightly to both wild type and mutant HIV-1 proteases. Structure and energy study." *J Med Chem*, **2003**. 46(9): pp. 1636-44.
- [169] Kempf, D.J., Norbeck, D.W., Codacovi, L.M., Wang, X.C., Kohlbrenner, W.E., Wideburg, N.E., Paul, D.A., Knigge, M.F., Vasavanonda, S., Craig-Kennard, A., Saldivar, A., Rosenbrook, W., Clement, J.J.J., Plattner, J.J., and Erickson, J., "Structure-Based, C2 Symmetric Inhibitors of HIV Protease." *J Med Chem*, **1990**. 33: pp. 2687-2689.
- [170] Chen, X., Li, L., Kempf, D., Sham, H.L., Wideburg, N., Saldivar, A., Vasavanonda, S., Marsh, K.C., McDonald, E., and Norbeck, D.W., "Evaluation of furofuran as a P2 ligand for symmetry based HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(23): pp. 2847-2852.
- [171] Erickson, J. and Kempf, D., "Structure-based design of symmetric inhibitors of HIV-1 protease." *Arch Virol*, **1994**(Suppl. 9): pp. 19-29.
- [172] Hosur, M.V., Bhat, T.N., Kempf, D.J., Baldwin, E.T., Liu, B., Gulnik, S., Wideburg, N.E., Norbeck, D.W., Appelt, K., and Erickson, J.W., "Influence of stereochemistry on activity and binding modes for C2 symmetry-based diol inhibitors of HIV-1 protease." *J Am Chem Soc*, **1994**. 116: pp. 847-855.

- [173] Kempf, D.J., Sham, H.L., Marsh, K.C., Flentge, C.A., Betenbenner, D., Green, B.E., McDonald, E., Vasavanonda, S., Saldivar, A., Wideburg, N.E., Kati, W.M., Ruiz, L., Zhao, C., Fino, L., Patterson, J., Molla, A., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "Discovery of Ritonavir, a Potent Inhibitor of HIV Protease with High Oral Bioavailability and Clinical Efficacy." *J Med.Chem*, **1998**. 41: pp. 602-617.
- [174] Lea, A.P. and Faulds, D., "Ritonavir." *Drugs*, **1996**. 52(4): pp. 541-546.
- [175] Kempf, D.J., Molla, A., Marsh, K.C., Park, C., Rodrigues, A.D., Korneyeva, M., Vasavanonda, S., McDonald, E., Flentge, C.A., Muchmore, S., Wideburg, N.E., Saldivar, A., Cooper, A., Kati, W.M., Steward, K.D., and Norbeck, D.W., "Lack of stereospecificity in the binding of the P2 amino acid of ritonavir to HIV protease." *Bioorg Med Chem Letter*, **1997**. 7(6): pp. 699-704.
- [176] Danner, S.A., Carr, A., Leonard, J.M., Lehman, L.M., Gudiol, F., Gonzales, J., Raventos, A., Rubio, R., Bouza, E., Pintado, V., Aguado, A.G., De Lomas, J.G., Delgado, R., Borleffs, J.C.C., Hsu, A., Valdes, J.M., Boucher, C.A.B., and Cooper, D.A., "A short term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of Ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease." *N Engl J Med*, **1995**. 333: pp. 1528-1533.
- [177] Kempf, D.J., Marsh, K.C., Denissen, J.F., McDonald, E., Vasavanonda, S., Flentge, C.A., Green, B.E., Fino, L., Park, C.H., Kong, X.P., Wideburg, N.E., Saldivar, A., Ruiz, L., Kati, W.M., Sham, H.L., Robins, T., Stewart, K.D., Hsu, A., Plattner, J.J., Leonard, J.M., and Norbeck, D.W., "ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**. 92(7): pp. 2484-2488.
- [178] Hsu, A., Granneman, G.R., Witt, G., Locke, C., Denissen, J., Molla, A., Valdes, J., Smith, J., Erdman, K., Lyons, N., Niu, P., Decourt, J.P., Fourtillan, J.B., Girault, J., and Leonard, J.M., "Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virus-infected subjects." *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(5): pp. 898-905.
- [179] Kempf, D.J., Marsh, K.C., Kumar, G., Rodrigues, A.D., Denissen, J.F., McDonald, E., Kukulka, M.J., Hsu, A., Granneman, G.R., Baroldi, P.A., Sun, E., Pizzuti, D., Plattner, J.J., Norbeck, D.W., and Leonard, J.M., "Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir." *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(3): pp. 654-660.
- [180] Nair, A.C., Bonin, I., Tossi, A., Welsh, W.J., and Miertus, S., "Computational studies of the resistance patterns of mutant HIV-1 aspartic proteases towards ABT-358 (ritonavir) and design of new derivatives." *J Mol Graph Model*, **2002**. 5339: pp. 1-9.
- [181] Nair, A.C., Miertus, S., Tossi, A., and Romeo, D., "A computational study of the resistance of HIV-1 aspartic protease to the inhibitors ABT-538 and VX-478 and design of new analogues." *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**. 242(3): pp. 545-551.
- [182] Markowitz, M., Mo, H.M., Kempf, D.J., Norbeck, D.W., Bhat, T.N., Erickson, J.W., and Ho, D.D., "Selection and analysis of human immunodeficiency virus type I variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor." *J Virol*, **1995**. 69(2): pp. 701-706.
- [183] Sham, H.L., Zhao, C., Li, L., Betebenner, D.A., Saldivar, A., Vasavanonda, S., Kempf, D.J., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "Novel lopinavir analogues incorporating non-Aromatic P-1 side chains-- synthesis and structure--activity relationships." *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**. 12(21): pp. 3101-3.

- [184] Molla, A., Mo, H., Vasavanonda, S., Han, L., Lin, C.T., Hsu, A., and Kempf, D.J., "In vitro antiviral interaction of lopinavir with other protease inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**. 46(7): pp. 2249-53.
- [185] Sham, H.L., Betebenner, D.A., Chen, X., Saldivar, A., Vasavanonda, S., Kempf, D.J., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of HIV- 1 protease inhibitors encompassing ABT-378 (Lopinavir)." *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**. 12(8): pp. 1185-7.
- [186] Stoll, V., Qin, W., Stewart, K.D., Jakob, C., Park, C., Walter, K., Simmer, R.L., Helfrich, R., Bussiere, D., Kao, J., Kempf, D., Sham, H.L., and Norbeck, D.W., "X-ray crystallographic structure of ABT-378 (Lopinavir) bound to HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem*, **2002**. 10(8): pp. 2803-6.
- [187] Kempf, D.J., Isaacson, J.D., King, M.S., Brun, S.C., Xu, Y., Real, K., Bernstein, B.M., Japour, A.J., Sun, E., and Rode, R.A., "Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor- experienced patients." *J Virol*, **2001**. 75(16): pp. 7462-9.
- [188] Sham, H.L., Betebenner, D.A., Herrin, T., Kumar, G., Saldivar, A., Vasavanonda, S., Molla, A., Kempf, D.J., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "Synthesis and antiviral activities of the major metabolites of the HIV protease inhibitor ABT-378 (Lopinavir)." *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**. 11(11): pp. 1351-3.
- [189] Hurst, M. and Faulds, D., "Lopinavir." *Drugs*, **2000**. 60(6): pp. 1371-9; discussion 1380-1.
- [190] Sham, H.L., Kempf, D.J., Molla, A., Marsh, K.C., Kumar, G.N., Chen, C.M., Kati, W., Stewart, K., Lal, R., Hsu, A., Betebenner, D., Korneyeva, M., Vasavanonda, S., McDonald, E., Saldivar, A., Wideburg, N., Chen, X., Niu, P., Park, C., Jayanti, V., Grabowski, B., Granneman, G.R., Sun, E., Japour, A.J., Norbeck, D.W., and et al., "ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease." *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**. 42(12): pp. 3218-24.
- [191] Carrillo, A., Stewart, K.D., Sham, H.L., Norbeck, D.W., Kohlbrenner, W.E., Leonard, J.M., Kempf, D.J., and Molla, A., "In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor." *J Virol*, **1998**. 72(9): pp. 7532-41.
- [192] Sham, H.L., Betebenner, D.A., Rosenbrook, W., Herrin, T., Saldivar, A., Vasavanonda, S., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "Novel lopinavir analogues incorporating heterocyclic replacements of six-member cyclic urea—synthesis and structure–activity relationships." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. 14(10): pp. 2643-2645.
- [193] Wachtmeister, J., Mühlman, A., Classon, B., Kvarnström, I., Hallberg, A., and Samuelson, B., "Impact of the central hydroxyl groups on the activity of symmetrical HIV-1 protease inhibitors derived from L-Mannaric acid." *Tetrahedron*, **2000**. 56: pp. 3219-3225.
- [194] Alterman, M., Björnsne, M., Mühlman, A., Classon, B., Kvarnström, I., Danielson, H., Markgren, P.-O., Nillröth, U., Unge, T., Hallberg, A., and Samuelson, B., "Design and synthesis of new potent C2-symmetric protease inhibitors. Use of L-mannaric acid as a peptidomimetic scaffold." *J Med Chem*, **1998**. 41: pp. 3782-3792.
- [195] Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craig, J.C., Duncan, I.B., Galpin, S.A., Handa, B.K., Kay, J., Kröhn, A., Lambert, R.W., Merret, J.H., Mills, J.S., Parkes, K.E.B., Redshaw, S., Ritchie, A.J., Taylor, D.L., Thomas, G.J., and Machin, P.J., "Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors." *Science*, **1990**. 248: pp. 358-361.

- [196] Kalish, V., Kaldor, S., Shetty, B., Tatlock, J., Davies, J., Hammond, M., Dressman, B., Fritz, J., Appelt, K., Reich, S., Musick, L., Wu, B.W., and Su, K., "Iterative protein structure-based drug design and synthesis of HIV protease inhibitors." *Eur J Med Chem*, **1995**. 30(Suppl.): pp. S201-S214.
- [197] Reich, S.H., Melnick, M., Pino, M.J., Fuhry, M.A.M., Trippe, A.J., Appelt, K., Davies, J.F., Wu, B.W., and Musick, L., "Structure-based design and synthesis of substituted 2-butanols as nonpeptidic inhibitors of HIV protease: Secondary amide series." *J Med Chem*, **1996**. 39(14): pp. 2781-2794.
- [198] Melnick, M., Reich, S.H., Lewis, K.K., Mitchell, L.J., Nguyen, D., Trippe, A.J., Dawson, H., Davies, J.F., Appelt, K., Wu, B.W., Musick, L., Gehlhaar, D.K., Webber, S., Shetty, B., Kosa, M., Kahil, D., and Andrada, D., "Bis tertiary amide inhibitors of the HIV-1 protease generated via protein structure-based iterative design." *J Med Chem*, **1996**. 39(14): pp. 2795-2811.
- [199] Kaldor, S.W., Kalish, V.J., Davies, J.F., Shetty, B.V., Fritz, J.E., Appelt, K., Burgess, J.A., Campanale, K.M., Chirgadze, N.Y., Clawson, D.K., Dressman, B.A., Hatch, S.D., Khalil, D.A., Kosa, M.B., Lubbehusen, P.P., Muesing, M.A., Patick, A.K., Reich, S.H., Su, K.S., and Tatlock, J.H., "Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): A potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease." *J Med Chem*, **1997**. 40(24): pp. 3979-3985.
- [200] Lamarre, D., Croteau, G., Wardrop, E., Bourgon, L., Thibeault, D., Clouette, C., Vaillancourt, M., Cohen, E., Pargellis, C., Yoakim, C., and Anderson, P.C., "Antiviral properties of palinavir, a potent inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease." *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(5): pp. 965-71.
- [201] Liard, F., Jaramillo, J., Paris, W.L., and Yoakim, C., "Pharmacokinetic aspects of palinavir, an HIV protease inhibitor, in Sprague-Dawley rats." *J Pharm Sci*, **1998**. 87(6): pp. 782-785.
- [202] Beaulieu, P.L., Wernic, D., Abraham, A., Anderson, P.C., Bogri, T., Bousquet, Y., Croteau, G., Guse, I., Lamarre, D., Liard, F., Paris, W., Thibeault, D., Pav, S., and Tong, L., "Potent HIV protease inhibitors containing a novel (hydroxyethyl)amide isostere." *J Med Chem*, **1997**. 40(14): pp. 2164-76.
- [203] Beaulieu, P.L., Anderson, P.C., Cameron, D.R., Croteau, G., Gorys, V., Grand-Maitre, C., Lamarre, D., Liard, F., Paris, W., Plamondon, L., Soucy, F., Thibeault, D., Wernic, D., Yoakim, C., Pav, S., and Tong, L., "2',6'-Dimethylphenoxyacetyl: a new achiral high affinity P(3)-P(2) ligand for peptidomimetic-based HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **2000**. 43(6): pp. 1094-108.
- [204] Kaldor, S.W., Hammond, M., Dressman, B.A., Fritz, J.E., Crowell, T.A., and Hermann, R.A., "New dipeptide isosteres useful for the inhibition of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **1994**. 4(11): pp. 1385-1390.
- [205] Shepherd, T.A., Jungheim, L.N., and Baxter, A.J., "D-amino acids as novel P-2/P-3 ligands for inhibitors of HIV-1 protease." *Bioorg. Med Chem Lett*, **1994**. 4(11): pp. 1391-1396.
- [206] Jungheim, L.N., Shepherd, T.A., Baxter, A.J., Burgess, J., Hatch, S.D., Lubbehusen, P., Wiskerchen, M., and Muesing, M.A., "Potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors that utilize noncoded D-amino acids as P2/P3 ligands." *J Med Chem*, **1996**. 39: pp. 96-108.
- [207] Lyle, T., Wiscount, C.M., Guare, J.P., Thompson, W.J., Anderson, P.S., Darke, P.L., Zugay, J.A., Emini, E.A., Schleif, W.A., Quintero, J.C., Dixon, A.F., Sigal, I.S., and Huff, J.R., "Benzocycloalkyl amines as novel c-termini for HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **1991**. 34: pp. 1228-1230.

- [208] Vacca, J.P., *Design of tight-binding human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors*, in *Retroviral Proteases*, Kuo, L.C. and Shafer, J.A., Editors. **1994**, Academic Press Inc: 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495. pp. 311-334.
- [209] Vacca, J.P., Dorsey, B.D., Schleif, W.A., Levin, R.B., McDaniel, S.L., Darke, P.L., Zugay, J., Quintero, J.C., Blahy, O.M., Roth, E., Sardana, V.V., Schlabach, A.J., Graham, P.I., Condra, J.H., Gotlib, L., Holloway, M.K., Lin, J., Chen, I.W., Vastag, K., Ostovic, D., Anderson, P.S., Emini, E.A., and Huff, J.R., "L-735,524 - An Orally Bioavailable Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**. 91(9): pp. 4096-4100.
- [210] Chen, H.G., Sawyer, T.K., and Wuts, P.G.M., "Synthesis of a new hydroxyethylene dipeptide isostere Phe Ψ (CH₂CH(OH))Phe as HIV-1 protease inhibitor." *Acta Pharmacol Sinica*, **1994**. 15(1): pp. 33-35.
- [211] Dorsey, B.D., Levin, R.B., McDaniel, S.L., Vacca, J.P., Guare, J.P., Darke, P.L., Zugay, J.A., Emini, E.A., Schleif, W.A., Quintero, J.C., Lin, J.H., Chen, I.W., Holloway, M.K., Fitzgerald, P.M.D., Axel, M.G., Ostovic, D., Anderson, P.S., and Huff, J.R., "L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor." *J Med Chem*, **1994**. 37(21): pp. 3443-3451.
- [212] Rano, T.A., Cheng, Y., Huening, T.T., Zhang, F., Schleif, W.A., Gabryelski, L., Olsen, D.B., Kuo, L.C., Lin, J.H., Xu, X., Olah, T.V., McLoughlin, D.A., King, R., Chapman, K.T., and Tata, J.R., "Combinatorial diversification of indinavir: in vivo mixture dosing of an HIV protease inhibitor library [In Process Citation]." *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**. 10(14): pp. 1527-30.
- [213] Cheng, Y., Zhang, F., Rano, T., Lu, Z., Schleif, W., Gabryelski, L., Olsen, D., Stahlhut, M., Rutkowski, C., Lin, J., Jin, L., Emini, E., Chapman, K., and Tata, J., "Indinavir analogues with blocked metabolism sites as HIV protease inhibitors with improved pharmacological profiles and high potency against PI-Resistant viral strains." *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**. 12(17): pp. 2419.
- [214] Cheng, Y., Rano, T.A., Huening, T.T., Zhang, F., Lu, Z., Schleif, W.A., Gabryelski, L., Olsen, D.B., Stahlhut, M., Kuo, L.C., Lin, J.H., Xu, X., Jin, L., Olah, T.V., McLoughlin, D.A., King, R.C., Chapman, K.T., and Tata, J.R., "A combinatorial library of indinavir analogues and its in vitro and in vivo studies." *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**. 12(4): pp. 529-32.
- [215] Lin, J.H., "Role of pharmacokinetics in the discovery and development of indinavir." *Adv Drug Deliv Rev*, **1999**. 39(1-3): pp. 33-49.
- [216] Duffy, J., Kevin, N., Kirk, B., Chapman, K., Schleif, W., Olsen, D., Stahlhut, M., Rutkowski, C., Kuo, L., Jin, L., Lin, J., Emini, E., and Tata, J., "Synthesis and activity of novel HIV protease inhibitors with improved potency against multiple PI-resistant viral strains." *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**. 12(17): pp. 2423.
- [217] Lu, Z., Raghavan, S., Bohn, J., Charest, M., Stahlhut, M.W., Rutkowski, C.A., Simcoe, A.L., Olsen, D.B., Schleif, W.A., Carella, A., Gabryelski, L., Jin, L., Lin, J.H., Emini, E., Chapman, K., and Tata, J.R., "Design and synthesis of highly potent HIV protease inhibitors with activity against resistant virus." *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**. 13(10): pp. 1821-4.
- [218] Kim, R.M., Rouse, E.A., Chapman, K.T., Schleif, W.A., Olsen, D.B., Stahlhut, M., Rutkowski, C.A., Emini, E.A., and Tata, J.R., "P1' oxadiazole protease inhibitors with excellent activity against native and protease inhibitor-resistant HIV-1." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. 14(18): pp. 4651-4654.
- [219] Dorsey, B.D., McDonough, C., McDaniel, S.L., Levin, R.B., Newton, C.L., Hoffman, J.M., Darke, P.L., Zugay-Murphy, J.A., Emini, E.A., Schleif, W.A., Olsen, D.B., Stahlhut, M.W., Rutkowski, C.A., Kuo, L.C., Lin, J.H., Chen, I.W., Michelson, S.R., Holloway, M.K., Huff, J.R., and

Vacca, J.P., "Identification of MK-944a: a second clinical candidate from the hydroxylaminepentanamide isostere series of HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **2000**. 43(18): pp. 3386-99.

[220] Weber, J., Majer, P., Litera, J., Urban, J., Soucek, M., Vondrasek, J., Konvalinka, J., Novek, P., Sedlacek, J., Strop, P., Krausslich, H.G., and Pichova, I., "Potency comparison of peptidomimetic inhibitors against HIV-1 and HIV-2 proteinases: design of equipotent lead compounds." *Arch Biochem Biophys*, **1997**. 341(1): pp. 62-9.

[221] Konvalinka, J., Litera, J., Weber, J., Vondrasek, J., Hradilek, M., Soucek, M., Pichova, I., Majer, P., Strop, P., Sedlacek, J., Heuser, A.M., Kottler, H., and Krausslich, H.G., "Configurations of diastereomeric hydroxyethylene isosteres strongly affect biological activities of a series of specific inhibitors of human-immunodeficiency-virus proteinase." *Eur J Biochem*, **1997**. 250(2): pp. 559-566.

[222] Weber, J., Mesters, J.R., Lepsik, M., Prejdova, J., Svec, M., Sponarova, J., Mlcochova, P., Skalicka, K., Strisovsky, K., Uhlikova, T., Soucek, M., Machala, L., Stankova, M., Vondrasek, J., Klimkait, T., Krausslich, H.G., Hilgenfeld, R., and Konvalinka, J., "Unusual binding mode of an HIV-1 protease inhibitor explains its potency against multi-drug-resistant virus strains." *J Mol Biol*, **2002**. 324(4): pp. 739-54.

[223] Cozens, R.M., Bold, G., Capraro, H.G., Faessler, A., Mestan, J., Lang, M., Poncioni, B., Stover, D., and Roesel, J.L., "Synthesis and pharmacological evaluation of CGP 57813 and CGP 61755, HIV-1 protease inhibitors from the Phe-c-Phe peptidomimetic class." *Antivir Chem Chemother*, **1996**. 7(6): pp. 294-299.

[224] Capraro, H.G., Bold, G., Faessler, A., Cozens, R., Klimkait, T., Lazdins, J., Mestan, J., Poncioni, B., Rosel, J.L., Stover, D., and Lang, M., "Synthesis of potent and orally active HIV-protease inhibitors." *Arch Pharm (Weinheim)*, **1996**. 329(6): pp. 273-8.

[225] Lazdins, J.K., Mestan, J., Goutte, G., Walker, M.R., Bold, G., Capraro, H.G., and Klimkait, T., "In vitro effect of alpha1-acid glycoprotein on the anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity of the protease inhibitor CGP 61755: a comparative study with other relevant HIV protease inhibitors." *J Infect Dis*, **1997**. 175(5): pp. 1063-70.

[226] Mimoto, T., Imai, J., Tanaka, H., Hattori, N., Takahashi, M., Kisanuki, S., Nagano, Y., Shintani, M., Hayashi, H., Sakikawa, H., Akaji, K., and Kiso, Y., "Rational design and synthesis of a novel class of active site-targeted HIV protease inhibitors containing a hydroxymethylcarbonyl isostere. Use of the phenylnorstatine or allophenylnorstatine as a transition state mimic." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **1991**. 39(9): pp. 2465-7.

[227] Mimoto, T., Imai, J., Kisanuki, S., Enomoto, H., Hattori, N., Akaji, K., and Kiso, Y., "Kynostatin (KNI)-227 and -272, highly potent anti-HIV agents: conformationally constrained tripeptide inhibitors of HIV protease containing allophenylnorstatine." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **1992**. 40(8): pp. 2251-3.

[228] Kageyama, S., Mimoto, T., Murakawa, Y., Nomizu, M., Ford, H.J., Shirasaka, T., Gulnik, S., Erickson, J., Takada, K., Hayashi, H., Border, S., Kiso, Y., and Mitsuya, H., "In vitro anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of transition state mimetic HIV protease inhibitors containing allophenylnorstatine." *Antimicrob Agents Chemother*, **1993**. 37(4): pp. 810-17.

[229] Kiso, Y., "Design and synthesis of substrate-based peptidomimetic human immunodeficiency virus protease inhibitors containing the hydroxymethylcarbonyl isostere." *Biopolymers*, **1996**. 40(2): pp. 235-244.

- [230] Kiso, Y., Matsumoto, H., Mizumoto, S., Kimura, T., Fujiwara, Y., and Akaji, K., "Small dipeptide-based HIV protease inhibitors containing the hydroxymethylcarbonyl isostere as an ideal transition-state mimic." *Biopolymers*, **1999**. 51(1): pp. 59-68.
- [231] Chokekijchai, S., Shirasaka, T., Weinstein, J.N., and Mitsuya, H., "In vitro anti-HIV-1 activity of HIV protease inhibitor KNI-272 in resting and activated cells: implications for its combined use with AZT or ddI." *Antiviral Res*, **1995**. 28: pp. 25-38.
- [232] Velazquez-Campoy, A., Luque, I., Todd, M.J., Milutinovich, M., Kiso, Y., and Freire, E., "Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor." *Protein Sci*, **2000**. 9(9): pp. 1801-9.
- [233] Ohno, Y., Kiso, Y., and Kobayashi, Y., "Solution conformations of KNI-272, a tripeptide HIV protease inhibitor designed on the basis of substrate transition state: determined by NMR spectroscopy and simulated annealing calculations." *Bioorg Med Chem*, **1996**. 4(9): pp. 1565-72.
- [234] Baldwin, E.T., Bhat, T.N., Gulnik, S., Liu, B.S., Topol, I.A., Kiso, Y., Mimoto, T., Mitsuya, H., and Erickson, J.W., "Structure of HIV-1 protease with KNI-272, a tight-binding transition-state analog containing allophenylnorstatine." *Structure*, **1995**. 3(6): pp. 581-590.
- [235] Doi, M., Kimura, T., Ishida, T., and Kiso, Y., "Rigid backbone moiety of KNI-272, a highly selective HIV protease inhibitor: methanol, acetone, and dimethylsulfoxide solvated forms of 3-[3-benzyl-2-hydroxyl-9-(isoquinolin-5-yloxy)-6-methylsulfanylmethyl-5,8-dioxo-4,7-diazanonanoyl]-N-tert-butyl-1,3-thiazolidine-4-carboxamide." *Acta Cryst B*, **2004**. 60: pp. 433-437.
- [236] Benatalah, Z., Trigui, N., Sicsic, S., Tonnaire, T., de Rosny, E., Boggetto, N., and Reboud, M., "Progress towards new conformationally constrained HIV-1 protease inhibitors." *Eur J Med Chem*, **1995**. 30(11): pp. 891-900.
- [237] Kahn, M., Nakanish, H., Chrusciel, R.A., Fitzpatrick, D., and Johnson, M.E., "Examination of HIV-1 protease secondary structure specificity using conformationally constrained inhibitors." *J Med Chem*, **1991**. 34: pp. 3395-3399.
- [238] Spaltenstein, A., Almond, M.R., Bock, W.J., Cleary, D.G., Furfine, E.S., Hazen, R.J., Kazmierski, W.M., Salituro, F.G., Tung, R.D., and Wright, L.L., "Novel inhibitors of HIV protease: design, synthesis and biological evaluation of picomolar inhibitors containing cyclic P1/P2 scaffolds." *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**. 10(11): pp. 1159-62.
- [239] Tyndall, J.D., Reid, R.C., Tyssen, D.P., Jardine, D.K., Todd, B., Passmore, M., March, D.R., Pattenden, L.K., Bergman, D.A., Alewood, D., Hu, S.H., Alewood, P.F., Birch, C.J., Martin, J.L., and Fairlie, D.P., "Synthesis, stability, antiviral activity, and protease-bound structures of substrate-mimicking constrained macrocyclic inhibitors of HIV-1 protease." *J Med Chem*, **2000**. 43(19): pp. 3495-504.
- [240] Martin, J.L., Begun, J., Schindeler, A., Wickramasinghe, W.A., Alewood, D., Alewood, P.F., Bergman, D.A., Brinkworth, R.I., Abbenante, G., March, D.R., Reid, R.C., and Fairlie, D.P., "Molecular recognition of macrocyclic peptidomimetic inhibitors by HIV-1 protease." *Biochemistry*, **1999**. 38(25): pp. 7978-88.
- [241] Ripka, A.S., Bohacek, R.S., and Rich, D.H., "Synthesis of novel cyclic protease inhibitors using Grubbs olefin metathesis." *Bioorg Medicinal Chem Letter*, **1998**. 8(4): pp. 357-360.
- [242] Abell, A.D. and Foulds, G.J., "Synthesis of a cis-conformationally restricted peptide bond isostere and its application to the inhibition of the HIV-1 protease." *J Chem Soc, Perkin Trans*, **1997**. 1: pp. 2475-2482.

- [243] Chen, J.J., Coles, P.J., Arnold, L.D., Smith, R.A., McDonald, I.D., Carrière, J., and Krantz, A., "Synthesis and activity of conformationally-constrained macrocyclic norstatine-based inhibitors of HIV protease." *Bioorg Med Chem.*, **1996**. 6(4): pp. 435-438.
- [244] Abbenante, G., Bergman, D.A., Brinkworth, R.I., March, D.R., Reid, R.C., Hunt, P.A., James, I.W., Dancer, R.J., Garnham, B., Stoermer, M.L., and Fairlie, D.P., "Structure-activity relationships for macrocyclic peptidomimetic inhibitor of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(21): pp. 2531-2536.
- [245] Abbenante, G., March, D.R., Bergman, D.A., Hunt, P.A., Garnham, B., Dancer, R.J., Martin, J.L., and Fairlie, D.P., "Regioselective structural and functional mimicry of peptides, design of hydrolytically-stable cyclic peptidomimetic inhibitors of HIV-1 protease." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117: pp. 10220-10226.
- [246] Ettmayer, P., Billich, A., Hecht, P., Rosenwirth, B., and Gstach, H., "Paracyclophanes: A novel class of water-soluble inhibitors of HIV proteinase." *J Med Chem*, **1996**. 39(17): pp. 3291-3299.
- [247] Podlogar, B.L., Farr, R.A., Friedrich, D., Tarnus, C., Huber, E.W., Cregge, R.J., and Schirlin, D., "Design, synthesis, and conformational analysis of a novel macrocyclic HIV-protease inhibitor." *J Med Chem*, **1994**. 37(22): pp. 3684-3692.
- [248] Reid, R.C., Pattenden, L.K., Tyndall, J.D., Martin, J.L., Walsh, T., and Fairlie, D.P., "Countering cooperative effects in protease inhibitors using constrained β -strand-mimicking templates in focused combinatorial libraries." *J Med Chem*, **2004**. 47: pp. 1641-1651.
- [249] Mak, C.C., Brik, A., Lerner, D.L., Elder, J.H., Morris, G.M., Olson, A.J., and Wong, C.H., "Design and synthesis of broad-based mono- and bi- cyclic inhibitors of FIV and HIV proteases." *Bioorg Med Chem*, **2003**. 11(9): pp. 2025-40.
- [250] Mak, C.C., Le, V.D., Lin, Y.C., Elder, J.H., and Wong, C.H., "Design, synthesis, and biological evaluation of HIV/FIV protease inhibitors incorporating a conformationally constrained macrocycle with a small P3' residue." *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**. 11(2): pp. 219-22.
- [251] Smith, A.B., 3rd, Favor, D.A., Sprengeler, P.A., Guzman, M.C., Carroll, P.J., Furst, G.T., and Hirschmann, R., "Molecular modeling, synthesis, and structures of N-methylated 3,5- linked pyrrolin-4-ones toward the creation of a privileged nonpeptide scaffold." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7(1): pp. 9-22.
- [252] Smith III, A.B., Hirschmann, R., Pasternak, A., Yao, W., and Sprengeler, P.A., "An orally bioavailable pyrrolinone inhibitor of HIV-1 protease: computational analysis and x-ray crystal structure of the enzyme complex." *J Med Chem*, **1997**. 40: pp. 2440-2444.
- [253] Bouygues, M., Medou, M., Chermann, J.-C., Camplo, M., and Kraus, J.-L., "Short and unexpectedly potent 3-pyrrolidinone type inhibitors of HIV-1 replication." *Eur J Med Chem*, **1998**. 33: pp. 445-450.
- [254] Smith III, A.B., Hirschmann, R., Pasternak, A., Akaishi, R., Guzman, M.C., Jones, D.R., Keenan, T.P., Sprengeler, P.A., Darke, P.L., Emini, E.A., Holloway, M.K., and Schleif, W.A., "Design and synthesis of peptidomimetic inhibitors of HIV-1 protease and renin. Evidence for improved transport." *J Med Chem*, **1994**. 37(2): pp. 215-218.
- [255] Humphrey, R.W., Wyvill, K.M., Nguyen, B.Y., Shay, L.E., Kohler, D.R., Steinberg, S.M., Ueno, T., Fukasawa, T., Shintani, M., Hayashi, H., Mitsuya, H., and Yarchoan, R., "A phase I trial of the pharmacokinetics, toxicity, and activity of KNI- 272, an inhibitor of HIV-1 protease, in patients with AIDS or symptomatic HIV infection." *Antiviral Res*, **1999**. 41(1): pp. 21-33.

- [256] Mueller, B.U., Anderson, B.D., Farley, M.Q., Murphy, R., Zuckerman, J., Jarosinski, P., Godwin, K., McCully, C.L., Mitsuya, H., Pizzo, P.A., and Balis, F.M., "Pharmacokinetics of the protease inhibitor KNI-272 in plasma and cerebrospinal fluid in nonhuman primates after intravenous dosing and in human immunodeficiency virus-infected children after intravenous and oral dosing." *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**. 42(7): pp. 1815-1818.
- [257] Churchill, D.R., Slade, P.M., Youle, M., Gazzard, B.G., and Weber, J.N., "A phase I/II study of the safety and activity of a microsphere formulation of KNI-272 in patients with HIV-1 infection." *J Antimicrob Chemother*, **2001**. 47(3): pp. 353-5.
- [258] Kiriyama, A., Nishiura, T., Ishino, M., Yamamoto, Y., Ogita, I., Kiso, Y., and Takada, K., "Binding characteristics of KNI-272 to pasma proteins, a new potent tripeptide HIV protease inhibitor." *Biopharm Drug Disp*, **1996**. 17: pp. 739-751.
- [259] Kiriyama, A., Nishiura, T., Yamaji, H., and Takada, K., "Metabolic characterization of a tripeptide human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, KNI-272, in rat liver microsomes." *Antimicrob Agents Chemother*, **1999**. 43(3): pp. 549-56.
- [260] Davis, D.A., Read-Connole, E., Pearson, K., Fales, H.M., Newcomb, F.M., Moskovitz, J., and Yarchoan, R., "Oxidative modifications of kynostatin-272, a potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor: potential mechanism for altered activity in monocytes/macrophages." *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**. 46(2): pp. 402-8.
- [261] Yoshimura, K., Kato, R., Yusa, K., Kavlick, M.F., Maroun, V., Nguyen, A., Mimoto, T., Ueno, T., Shintani, M., Falloon, J., Masur, H., Hayashi, H., Erickson, J., and Mitsuya, H., "JE-2147: a dipeptide protease inhibitor (PI) that potently inhibits multi-PI-resistant HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**. 96(15): pp. 8675-80.
- [262] Kiso, Y., Yamaguchi, S., Matsumoto, H., Mimoto, T., Kato, R., Nojima, S., Takaku, H., Fukazawa, T., Kimura, T., and Akaji, K., "KNI-577, a potent small-size HIV protease inhibitor based on the dipeptide containing the hydroxymethylcarbonyl isostere as an ideal transition-state mimic." *Arch Pharm Pharm Med Chem*, **1998**. 331: pp. 87-89.
- [263] Mimoto, K., Kato, R., Takaku, H., Nojima, S., Terashima, K., Misawa, S., Fukazawa, T., Ueno, T., Sato, H., Hintani, M., Kiso, Y., and Hayashi, H., "Structure-Activity Relationship of Small-Sized HIV Protease Inhibitors Containing Allophenylnorstatine." *J Med Chem*, **1999**. 42: pp. 1789-1802.
- [264] Mimoto, T., Hattori, N., Takaku, H., Kisanuki, S., Fukazawa, T., Terashima, K., Kato, R., Nojima, S., Misawa, S., Ueno, T., Imai, J., Enomoto, H., Tanaka, S., Sakikawa, H., Shintani, M., Hayashi, H., and Kiso, Y., "Structure-activity relationship of orally potent tripeptide-based HIV protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl isostere [In Process Citation]." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **2000**. 48(9): pp. 1310-26.
- [265] Mimoto, T., Terashima, K., Nojima, S., Takaku, H., Nakayama, M., Shintani, M., Yamaoka, T., and Hayashi, Y., "Structure-activity and structure-metabolism relationships of HIV protease inhibitors containing the 3-hydroxy-2-methylbenzoyl-allophenylnorstatine structure." *Bioorg Med Chem*, **2004**. 12(1): p. 281-293.
- [266] Hamada, Y., Ohtake, J., Sohma, Y., Kimura, T., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "New water-soluble prodrugs of HIV protease inhibitors based on O->N intramolecular acyl migration." *Bioorg Med Chem*, **2002**. 10(12): pp. 4155-67.

- [267] Matsumoto, H., Sohma, Y., Kimura, T., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Controlled drug release: new water-soluble prodrugs of an HIV protease inhibitor." *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**. 11(4): pp. 605-9.
- [268] Hamada, Y., Matsumoto, H., Yamaguchi, S., Kimura, T., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Water-soluble prodrugs of dipeptide HIV protease inhibitors based on O->N intramolecular acyl migration: Design, synthesis and kinetic study." *Bioorg Med Chem*, **2004**. 12(1): pp. 159-170.
- [269] Matsumoto, H., Kimura, T., Hamawaki, T., Kumagai, A., Goto, T., Sano, K., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Design, synthesis, and biological evaluation of anti-HIV double-drugs. Conjugates of HIV protease inhibitors with a reverse transcriptase inhibitor through spontaneously cleavable linkers." *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(6): pp. 1589-600.
- [270] Le, V.D., Mak, C.C., Lin, Y.C., Elder, J.H., and Wong, C.H., "Structure-activity studies of FIV and HIV protease inhibitors containing allophenylnorstatine." *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(5): pp. 1185-95.
- [271] Matsumoto, H., Hamawaki, T., Ota, H., Kimura, T., Goto, T., Sano, K., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Double-Drugs--a new class of prodrug form of an HIV protease inhibitor conjugated with a reverse transcriptase inhibitor by a spontaneously cleavable linker." *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**. 10(11): pp. 1227-31.
- [272] Matsumoto, H., Matsuda, T., Nakata, S., Mitoguchi, T., Kimura, T., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Synthesis and biological evaluation of prodrug-type anti-HIV agents: ester conjugates of carboxylic acid-containing dipeptide HIV protease inhibitors and a reverse transcriptase inhibitor." *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(2): pp. 417-30.
- [273] Kimura, T., Matsumoto, H., Matsuda, T., Hamawaki, T., Akaji, K., and Kiso, Y., "A new class of anti-HIV agents: synthesis and activity of conjugates of HIV protease inhibitors with a reverse transcriptase inhibitor." *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**. 9(6): pp. 803-6.
- [274] Takashiro, E., Nakamura, Y., Miyamoto, S., Ozawa, Y., Sugiyama, A., and Fujimoto, K., "Design and synthesis of a novel series of HIV-1 protease inhibitors." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7(9): pp. 2105-14.
- [275] Takashiro, E., Hayakawa, I., Nitta, T., Kasuya, A., Miyamoto, S., Ozawa, Y., Yagi, R., Yamamoto, I., Shibayama, T., Nakagawa, A., and Yabe, Y., "Structure-activity relationship of HIV-1 protease inhibitors containing alpha-hydroxy-beta-amino acids. Detailed study of P1 site." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7(9): pp. 2063-72.
- [276] Takashiro, E., Watanabe, T., Nitta, T., Kasuya, A., Miyamoto, S., Ozawa, Y., Yagi, R., Nishigaki, T., Shibayama, T., Nakagawa, A., Iwamoto, A., and Yabe, Y., "Structure-activity relationship of HIV-1 protease inhibitors containing AHPBA. Part III: Modification of P-2 site." *Bioorg Med Chem*, **1998**. 6(5): pp. 595-604.
- [277] Komai, T., Higashida, S., Sakurai, M., Nitta, T., Kasuya, A., Miyamoto, S., Yagi, R., Ozawa, Y., Handa, H., Mohri, H., Yasuoka, A., Oka, S., Nishigaki, T., Kimura, S., Shimada, K., and Yabe, Y., "Structure-activity relationships of HIV-1 PR inhibitors containing AHPBA--II. Modification of pyrrolidine ring at P1' proline." *Bioorg Med Chem*, **1996**. 4(8): pp. 1365-77.
- [278] Komai, T., Yagi, R., Suzuki-Sunagawa, H., Sakurai, M., Higashida, S., Sugano, M., Handa, H., Mohri, H., Yasuoka, A., Oka, S., Yabe, Y., Nishigaki, T., Kimura, S., and Shimada, K., "In vitro and ex vivo anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of a new water-soluble HIV protease inhibitor, R-87366, containing (2S,3S)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid." *Biol Pharm Bull*, **1997**. 20(2): pp. 175-80.

- [279] Sakurai, M., Higashida, S., Sugano, M., Komai, T., Yagi, R., Ozawa, Y., Handa, H., Nishigaki, T., and Yabe, Y., "Structure-activity relationships of HIV-1 PR inhibitors containing AHPBA." *Bioorg Med Chem*, **1994**. 2(8): pp. 807-25.
- [280] Huang, X., Xu, L., Luo, X., Fan, K., Ji, R., Pei, G., Chen, K., and Jiang, H., "Elucidating the inhibiting mode of AHPBA derivatives against HIV-1 protease and building predictive 3D-QSAR models." *J Med Chem*, **2002**. 45(2): pp. 333-43.
- [281] Rinnova, M., Hradilek, M., Barinka, C., Weber, J., Soucek, M., Vondrasek, J., Klimkait, T., and Konvalinka, J., "A picomolar inhibitor of resistant strains of human immunodeficiency virus protease identified by a combinatorial approach." *Arch Biochem Biophys*, **2000**. 382(1): pp. 22-30.
- [282] Brynda, J., Rezacova, P., Fabry, M., Horejsi, M., Stouracova, R., Sedlacek, J., Soucek, M., Hradilek, M., Lepsik, M., and Konvalinka, J., "A phenylnorstatine inhibitor binding to HIV-1 protease: geometry, protonation, and subsite pocket interactions analyse at atomic resolution." *J Med Chem*, **2004**. 47: pp. 2030-2036.
- [283] Kim, E.E., Baker, C.T., Dwyer, M.D., Murcko, M.A., Rao, B.G., Tung, R.D., and Navia, M.A., "Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117(3): pp. 1181-1182.
- [284] Livingston, D.J., Pazhanisamy, S., Porter, D.J.T., Partaledis, J.A., Tung, R.D., and Painter, G.R., "weak binding of VX-478 to human plasma proteins and implications for anti-human immunodeficiency virus therapy." *J Infect Dis*, **1995**. 172: pp. 1238-1245.
- [285] Partaledis, J.A., Yamaguchi, K., Tisdale, M., Blair, E.E., Falcione, C., Maschera, B., Myers, R.E., Pazhanisamy, S., Futer, O., Cullinan, A.B., Stuver, C.M., Byrn, R.A., and Livingston, D.J., "In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates with reduced sensitivity to hydroxyethylamino sulfonamide inhibitors of HIV-1 aspartyl protease." *J Virol*, **1995**. 69(9): pp. 5228-5235.
- [286] St Clair, M.H., Millard, J., Rooney, J., Tisdale, M., Parry, N., Sadler, B.M., Blum, M.R., and Painter, G., "In vitro antiviral activity of 141W94 (VX-478) in combination with other antiretroviral agents." *Antiviral Res*, **1996**. 29(1): pp. 53-6.
- [287] Schmidt, B., Korn, K., Moschik, B., Paatz, C., Uberla, K., and Walter, H., "Low level of cross-resistance to amprenavir (141W94) in samples from patients pretreated with other protease inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**. 44(11): pp. 3213-6.
- [288] Decker, C.J., Laitinen, L.M., Bridson, G.W., Raybuck, S.A., Tung, R.D., and Chaturvedi, P.R., "Metabolism of amprenavir in liver microsomes: Role of CYP3A4 inhibition for drug interactions." *J Pharm Sci*, **1998**. 87(7): pp. 803-807.
- [289] Noble, S. and Goa, K.L., "Amprenavir: a review of its clinical potential in patients with HIV infection." *Drugs*, **2000**. 60(6): pp. 1383-410.
- [290] Ziermann, R., Limoli, K., Das, K., Arnold, E., Petropoulos, C.J., and Parkin, N.T., "A mutation in human immunodeficiency virus type 1 protease, N88S, that causes in vitro hypersensitivity to amprenavir." *J Virol*, **2000**. 74(9): pp. 4414-9.
- [291] Fung, H.B., Kirschenbaum, H.L., and Hameed, R., "Amprenavir: a new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor." *Clin Ther*, **2000**. 22(5): pp. 549-72.
- [292] Chaudry, N.I., Eron, J.J., Naderer, O.J., Pereira, A.S., Wire, M.B., Fiscus, S.A., and Kashuba, A.D., "Effects of formulation and dosing strategy on amprenavir concentrations in the seminal plasma of human immunodeficiency virus type 1-infected men." *Clin Infect Dis*, **2002**. 35(6): pp. 760-2.

- [293] Falcoz, C., Jenkins, J.M., Bye, C., Hardman, T.C., Kenney, K.B., Studenberg, S., Fuder, H., and Prince, W.T., "Pharmacokinetics of GW433908, a prodrug of amprenavir, in healthy male volunteers." *J Clin Pharmacol*, **2002**. 42(8): pp. 887-98.
- [294] Corbett, A.H. and Kashuba, A.D., "Fosamprenavir. Vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline." *Curr Opin Investig Drugs*, **2002**. 3(3): pp. 384-90.
- [295] Ghosh, A.K., Krishnan, K., Walters, D.E., Cho, W., Cho, H., Koo, Y., Trevino, J., Holland, L., and Buthod, J., "Structure based design: novel spirocyclic ethers as nonpeptidal P2- ligands for HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8(8): pp. 979-82.
- [296] Ghosh, A.K., Pretzer, E., Cho, H., Hussain, K.A., and Duzgunes, N., "Antiviral activity of UIC-PI, a novel inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease." *Antiviral Res*, **2002**. 54(1): pp. 29-36.
- [297] Yoshimura, K., Kato, R., Kavlick, M.F., Nguyen, A., Maroun, V., Maeda, K., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., Gulnik, S.V., Erickson, J.W., and Mitsuya, H., "A potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, UIC- 94003 (TMC-126), and selection of a novel (A28S) mutation in the protease active site." *J Virol*, **2002**. 76(3): pp. 1349-58.
- [298] Ghosh, A.K., Shin, D., Swanson, L., Krishnan, K., Cho, H., Hussain, K.A., Walters, D.E., Holland, L., and Buthod, J., "Structure-based design of non-peptide HIV protease inhibitors." *Il Farmaco*, **2001**. 56(1-2): pp. 29-32.
- [299] Ghosh, A.K., Kincaid, J.F., Cho, W.H., Walters, D.E., Krishnan, K., Hussain, K.A., Koo, Y., Cho, H., Rudall, C., Holland, L., and Buthod, J., "Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P-2-ligands and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere." *Bioorg Medicinal Chem Letter*, **1998**. 8(6): pp. 687-690.
- [300] Miller, J.F., Furfine, E.S., Hanlon, M.H., Hazen, R.J., Ray, J.A., Robinson, L., Samano, V., and Spaltenstein, A., "Novel arylsulfonamides possessing sub-picomolar HIV protease activities and potent anti-HIV activity against wild-type and drug-resistant viral strains." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. 14(4): pp. 959-963.
- [301] Gulick, R.M., "New antiretroviral drugs." *Clin Microbiol Infect*, **2003**. 9(3): pp. 186-93.
- [302] Getman, D.P., DeCrescenzo, G.A., Heintz, R.M., Reed, K.L., Talley, J.J., Bryant, M.L., Clare, M., Houseman, K.A., Marr, J.J., Mueller, R.A., *et al.*, "Discovery of a novel class of potent HIV-1 protease inhibitors containing the (R)-(hydroxyethyl)urea isostere." *J Med Chem*, **1993**. 36(2): pp. 288-91.
- [303] Bryant, M., Getman, D., Smidt, M., Marr, J., Clare, M., Dillard, R., Lansky, D., DeCrescenzo, G., Heintz, R., Houseman, K., Reed, K., Stolzenbach, J., Talley, J., Vazquez, M., and Mueller, R., "SC-52151, a novel inhibitor of the human immunodeficiency virus protease." *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**. 39(10): pp. 2229-2234.
- [304] Vazquez, M.L., Bryant, M.L., Clare, M., Decrescenzo, G.A., Doherty, E.M., Freskos, J.N., Getman, D.P., Houseman, K.A., Julien, J.A., Kocan, G.P., Mueller, R.A., Shieh, H.S., Stallings, W.C., Stegeman, R.A., and Talley, J.J., "Inhibitors of HIV-1 protease containing the novel and potent (R)-(hydroxyethyl)sulfonamide isostere." *J Med Chem*, **1995**. 38(4): pp. 581-584.
- [305] Freskos, J.N., Bertenshaw, D.E., Getman, D.P., Heintz, R.M., Mischke, B.V., Blystone, L.W., Bryant, M.L., Funckes-Shippy, C., Houseman, K.A., Kishore, N.N., Kocan, G.P., and Mehta, P.P., "(hydroxyethyl) sulfonamid HIV-1 protease inhibitors: identification of the 2-methylbenzoyl moiety at P-2." *Bioorg Med Chem*, **1996**. 6(4): pp. 445-450.

- [306] Nagarajan, S.R., De Crescenzo, G.A., Getman, D.P., Lu, H.-F., Sikorski, J.A., Walker, J.L., McDonald, J.J., Houseman, K.A., Kocan, G.P., Kishore, N., Mehta, P.P., Funkes-Shippy, C.L., and Blystone, L., "Discovery of novel benzothiazolesulfonamides as potent inhibitors of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem*, **2003**. 11(22): pp. 4769-4777.
- [307] Kaltenbach, R.F., 3rd, Trainor, G., Getman, D., Harris, G., Garber, S., Cordova, B., Bacheler, L., Jeffrey, S., Logue, K., Cawood, P., Klabe, R., Diamond, S., Davies, M., Saye, J., Jona, J., and Erickson-Viitanen, S., "DPC 681 and DPC 684: potent, selective inhibitors of human immunodeficiency virus protease active against clinically relevant mutant variants." *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**. 45(11): pp. 3021-8.
- [308] Priestle, J.P., Fassler, A., Rosel, J., Tintelnot-Blomley, M., Strop, P., and Grutter, M.G., "Comparative analysis of the X-ray structures of HIV-1 and HIV-2 proteases in complex with CGP 53820, a novel pseudosymmetric inhibitor." *Structure*, **1995**. 3(4): pp. 381-389.
- [309] Fassler, A., Bold, G., Capraro, H.G., Cozens, R., Mestan, J., Poncioni, B., Rosel, J., Tintelnot-Blomley, M., and Lang, M., "Aza-peptide analogs as potent human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors with oral bioavailability." *J Med Chem*, **1996**. 39(16): pp. 3203-3216.
- [310] Bold, G., Fässler, A., Capraro, H.G., Cozens, R., Klimkait, T., Lazdins, J., Mestan, J., Poncioni, B., Rösel, J., Stover, D., Tintelnot-Blomley, M., Acemoglu, F., Beck, W., Boss, E., Eschbach, M., Hürlimann, T., Masso, E., Roussel, S., Ucci-Stoll, K., Wyss, D., and Lang, M., "New aza-dipeptide analogues as potent and orally absorbed HIV-1 protease inhibitors: Candidates for clinical development." *J Med Chem*, **1998**. 41: pp. 3387-3401.
- [311] Robinson, B.S., Riccardi, K.A., Gong, Y.F., Guo, Q., Stock, D.A., Blair, W.S., Terry, B.J., Deminie, C.A., Djang, F., Colonno, R.J., and Lin, P.F., "BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents." *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**. 44(8): pp. 2093-9.
- [312] Gong, Y.F., Robinson, B.S., Rose, R.E., Deminie, C., Spicer, T.P., Stock, D., Colonno, R.J., and Lin, P.F., "In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632." *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**. 44(9): pp. 2319-26.
- [313] Sham, H.L., Betebenner, D.A., Wideburg, N.E., Saldivar, A.C., Kohlbrenner, W.E., Vasavanonda, S., Kempf, D.J., Norbeck, D.W., Zhao, C., Clement, J.J., Erickson, J.E., and Plattner, J.J., "Potent HIV-1 protease inhibitors with antiviral activities in vitro." *Biochem and Biophys Res Comm*, **1991**. 175(3): pp. 914-919.
- [314] Sham, H.L., Wideburg, N.E., Spanton, S.G., Kohlbrenner, W.E., Betebenner, D.A., Kempf, D.J., Norbeck, D.W., Plattner, J.J., and Erickson, J.W., "Synthesis of (2S,5S,4R)-2,5-Diamino-3,3-difluoro-1,6-diphenylhydroxyhexane: the core unit of a potent HIV proteinase inhibitor." *J Chem Soc, Chem Commun*, **1991**. (2): pp. 110-112.
- [315] Schirlin, D., Baltzer, S., Altenburger, J.M., Tarnus, C., and Remy, J.M., "Difluoromethyleneketone retroamide, a versatile concept of inactivation of proteolytic enzymes." *Tetrahedron*, **1996**. 52(1): pp. 305-318.
- [316] Schirlin, D., Baltzer, S., Van Dorsselaer, V., Weber, F., Weill, C., Altenburger, J.M., Neises, B., Flynn, G., Rémy, J.M., and Tarnus, C., "Short and unexpectedly potent difluorostatone type inhibitors of HIV-1 protease." *Bioorg. Medicinal Chem.*, **1993**. 3(2): pp. 253-258.
- [317] Schirlin, D., Vandorsselaer, V., Tarnus, C., Taylor, D.L., Tyms, A.S., Baltzer, S., Weber, F., Remy, J.M., Brennan, T., Farr, R., and Janowick, D., "Beneficial Replacement of the P-1

Phenylalanine Side Chain in HIV-1 Protease Inhibitors of the Difluorostatone Type." *Bioorg Med Chem Letter*, **1994**. 4(2): pp. 241-246.

[318] Vandorselaer, V., Schirlin, D., Tarnus, C., Taylor, D.L., Tyms, A.S., Weber, F., Baltzer, S., Remy, J.M., Brennan, T., and Janowick, D., "Increased Antiviral Activity of HIV Protease Inhibitors of the Difluorostatone Type Bearing (R)-valinol Derivatives as Novel C-termini." *Bioorg Med Chem Letter*, **1994**. 4(10): pp. 1213-1218.

[319] Taylor, D.L., Ahmed, P.S., Brennan, T.M., Bridges, C.G., Tyms, A.S., Van Dorselaer, V., Tarnus, C., Hornsperger, J.-M., and Schirlin, D., "Anti-human immunodeficiency virus activity, bioavailability and drug resistance profile of the novel proteinase inhibitor MDL 74,695." *Antivir Chem & Chemother*, **1997**. 8(3): pp. 205-214.

[320] Chen, C.A., Sieburth, S.M., Glekas, A., Hewitt, G.W., Trainor, G.L., Erickson-Viitanen, S., Garber, S.S., Cordova, B., Jeffry, S., and Klabe, R.M., "Drug design with a new transition state analog of the hydrated carbonyl: silicon-based inhibitors of the HIV protease." *Chem Biol*, **2001**. 8(12): pp. 1161-6.

[321] Peyman, A., Budt, K.H., Spanig, J., and Ruppert, D., "Phosphinic acid-based C2-symmetrical inhibitors of HIV-protease." *Angew Chem, Int Ed Engl*, **1993**. 32(12): pp. 1720-1722.

[322] Thaisrivongs, S. and Strohbach, J.W., "Structure-based discovery of Tipranavir disodium (PNU-140690E): a potent, orally bioavailable, nonpeptidic HIV protease inhibitor." *Biopolymers*, **1999**. 51(1): pp. 51-8.

[323] Thaisrivongs, S., Tomich, P.K., Watenpaugh, K.D., Chong, K.T., Howe, W.J., Yang, C.P., Strohbach, J.W., Turner, S.R., Mcgrath, J.P., Bohanon, M.J., Lynn, J.C., Mulichak, A.M., Spinelli, P.A., Hinshaw, R.R., Pagano, P.J., Moon, J.B., Ruwart, M.J., Wilkinson, K.F., Rush, B.D., Zipp, G.L., Dalga, R.J., Schwende, F.J., Howard, G.M., Padbury, G.E., Toth, L.N., Zhao, Z.Y., Koeplinger, K.A., Kakuk, T.J., Cole, S.L., Zaya, R.M., Piper, R.C., and Jeffrey, P., "Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-Hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors." *J Med Chem*, **1994**. 37(20): pp. 3200-3204.

[324] Thaisrivongs, S., Watenpaugh, K.D., Howe, W.J., Tomich, P.K., Dolak, L.A., Chong, K.T., Tomich, C.S.C., Tomasselli, A.G., Turner, S.R., Strohbach, J.W., Mulichak, A.M., Janakiraman, M.N., Moon, J.B., Lynn, J.C., Horng, M.M., Hinshaw, R.R., Curry, K.A., and Rothrock, D.J., "Structure-based design of novel HIV protease inhibitors: Carboxamide-containing 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as potent nonpeptidic inhibitors." *J Med Chem*, **1995**. 38(18): pp. 3624-3637.

[325] Romines, K.R., Watenpaugh, K.D., Tomich, P.K., Howe, W.J., Morris, J.K., Lovasz, K.D., Mulichak, A.M., Finzel, B.C., Lynn, J.C., Horng, M.M., Schwende, F.J., Ruwart, M.J., Zipp, G.L., Chong, K.T., Dolak, L.A., Toth, L.N., Howard, G.M., Rush, B.D., Wilkinson, K.F., Possert, P.L., Dalga, R.J., and Hinshaw, R.R., "Use of medium-sized cycloalkyl rings to enhance secondary binding: Discovery of a new class of human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors." *J Med Chem*, **1995**. 38(11): pp. 1884-1891.

[326] Romines, K.R., Watenpaugh, K.D., Howe, W.J., Tomich, P.K., Lovasz, K.D., Morris, J.K., Janakiraman, M.N., Lynn, J.C., Horng, M.M., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., and Dolak, L.A., "Structure-based design of nonpeptidic HIV protease inhibitors from a cyclooctylpyranone lead structure." *J Med Chem*, **1995**. 38(22): pp. 4463-4473.

[327] Romines, K.R., Morris, J.K., Howe, W.J., Tomich, P.K., Horng, M.M., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Anderson, D.J., Strohbach, J.W., Turner, S.R., and Mizesak, S.A.,

"Cycloalkylpyranones and Cycloalkyldihydropyrones as HIV Protease Inhibitors: Exploring the Impact of Ring Size on Structure-Activity Relationships." *J Med Chem*, **1996**. 39: pp. 4125-4130.

[328] Thaisrivongs, S., Romero, D.L., Tommasi, R.A., Janakiraman, M.N., Strohbach, J.W., Turner, S.R., Biles, C., Morge, R.R., Johnson, P.D., Aristoff, P.A., Tomich, P.K., Lynn, J.C., Horng, M.M., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Howe, W.J., Finzel, B.C., and Watenpaugh, K.D., "Structure-based design of HIV protease inhibitors: 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as effective, nonpeptidic inhibitors." *J Med Chem*, **1996**. 39(23): pp. 4630-42.

[329] Thaisrivongs, S., Janakiraman, M.N., Chong, K.T., Tomich, P.K., Dolak, L.A., Turner, S.R., Strohbach, J.W., Lynn, J.C., Horng, M.M., Hinshaw, R.R., and Watenpaugh, K.D., "Structure-based design of novel HIV protease inhibitors: Sulfonamide-containing 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as potent non-peptidic inhibitors." *J Med Chem*, **1996**. 39(12): pp. 2400-2410.

[330] Thaisrivongs, S., Skulnick, H.I., Turner, S.R., Strohbach, J.W., Tommasi, R.A., Johnson, P.D., Aristoff, P.A., Judge, T.M., Gammill, R.B., Morris, J.K., Romines, K.R., Chrusciel, R.A., Hinshaw, R.R., Chong, K.T., Tarpley, W.G., Poppe, S.M., Slade, D.E., Lynn, J.C., Horng, M.M., Tomich, P.K., Seest, E.P., Dolak, L.A., Howe, W.J., Howard, G.M., Watenpaugh, K.D., *et al.*, "Structure-based design of HIV protease inhibitors: sulfonamide-containing 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors." *J Med Chem*, **1996**. 39(22): pp. 4349-53.

[331] Skulnick, H.I., Johnson, P.D., Aristoff, P.A., Morris, J.K., Lovasz, K.D., Howe, W.J., Watenpaugh, K.D., Janakiraman, M.N., Anderson, D.J., Reischer, R.J., Schwartz, T.M., Banitt, L.S., Tomich, P.K., Lynn, J.C., Horng, M.M., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Dolak, L.A., Seest, E.P., Schwende, F.J., Rush, B.D., Howard, G.M., Toth, L.N., Wilkinson, K.R., Romines, K.R., *et al.*, "Structure-based design of nonpeptidic HIV protease inhibitors: the sulfonamide-substituted cyclooctylpyranones." *J Med Chem*, **1997**. 40(7): pp. 1149-64.

[332] Skulnick, H.I., Johnson, P.D., Howe, W.J., Tomich, P.K., Chong, K.T., Watenpaugh, K.D., Janakiraman, M.N., Dolak, L.A., Mcgrath, J.P., Lynn, J.C., Horng, M.M., Hinshaw, R.R., Zipp, G.L., Ruwart, M.J., Schwende, F.J., Zhong, W.Z., Padbury, G.E., Dalga, R.J., Shiou, L.H., Possert, P.L., Rush, B.D., Wilkinson, K.F., Howard, G.M., Toth, L.N., Williams, M.G., Kakuk, T.J., Cole, S.L., Zaya, R.M., Lovasz, K.D., Morris, J.K., Romines, K.R., Thaisrivongs, S., and Aristoff, P.A., "Structure-based design of sulfonamide-substituted non-peptidic HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **1995**. 38(26): pp. 4968-4971.

[333] Schwartz, T.M., Bundy, G.L., Strohbach, J.W., Thaisrivongs, S., Johnson, P.D., Skulnick, H.I., Tomich, P.K., Lynn, J.C., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Raub, T.J., Padbury, G.E., and Toth, L.N., "Synthesis and pharmacological evaluation of sulfone substituted HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1997**. 7(4): pp. 399-402.

[334] Janakiraman, M.N., Watenpaugh, K.D., Tomich, P.K., Chong, K.T., Turner, S.R., Tommasi, R.A., Thaisrivongs, S., and Strohbach, J.W., "Non-peptidic HIV protease inhibitors: C2-symmetry-based design of bis-sulfonamide dihydropyrones." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8(10): pp. 1237-1242.

[335] Turner, S.R., Strohbach, J.W., Tommasi, R.A., Aristoff, P.A., Johnson, P.D., Skulnick, H.I., Dolak, L.A., Seest, E.P., Tomich, P.K., Bohanon, M.J., Horng, M.M., Lynn, J.C., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Watenpaugh, K.D., Janakiraman, M.N., and Thaisrivongs, S., "Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic, HIV protease inhibitor of the 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class." *J Med Chem*, **1998**. 1998(41): pp. 3467-3476.

[336] Poppe, S.M., Slade, D.E., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Pagano, P.J., Markowitz, M., Ho, D.D., Mo, H., Gorman, R.R., 3rd, Dueweke, T.J., Thaisrivongs, S., and Tarpley, W.G., "Antiviral

activity of the dihydropyrene PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor." *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(5): pp. 1058-63.

[337] Larder, B.A., Hertogs, K., Bloor, S., van den Eynde, C.H., DeCian, W., Wang, Y., Freimuth, W.W., and Tarpley, G., "Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples." *Aids*, **2000**. 14(13): pp. 1943-8.

[338] Back, N.K., van Wijk, A., Remmerswaal, D., van Monfort, M., Nijhuis, M., Schuurman, R., and Boucher, C.A., "In-vitro tipranavir susceptibility of HIV-1 isolates with reduced susceptibility to other protease inhibitors." *Aids*, **2000**. 14(1): pp. 101-2.

[339] Rusconi, S., La Seta Catamancio, S., Citterio, P., Kurtagic, S., Violin, M., Balotta, C., Moroni, M., Galli, M., and d'Arminio-Monforte, A., "Susceptibility to PNU-140690 (Tipranavir) of human immunodeficiency virus type 1 isolates derived from patients with multidrug resistance to other protease inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**. 44(5): pp. 1328-32.

[340] Chong, K.T. and Pagano, P.J., "In vitro combination of PNU-140690, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, with ritonavir against ritonavir-sensitive and -resistant clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(11): pp. 2367-2373.

[341] Hagen, S., Vara Prasad, J.V.N., and Tait, B.D., "Non peptide inhibitors of HIV protease." *Adv Med Chem*, **2000**. 5: pp. 159-195.

[342] Tummino, P.J., Prasad, J.V.N. Vara, Ferguson, D., Nouhan, C., Graham, N., Domagala, J.M., Ellsworth, E., Gajda, C., Hagen, S.E., Lunney, E.A., Para, K.S., Tait, B.D., Pavlovsky, A., Erickson, J.W., Gracheck, S., McQuade, T.J., and Hupe, D.J., "Discovery and optimization of nonpeptide HIV-1 protease inhibitors." *Bioorg Med Chem*, **1996**. 4(9): pp. 1401-10.

[343] Tummino, P.J., Ferguson, D., and Hupe, D., "Competitive inhibition of HIV-1 protease by warfarin derivatives." *Biochem Biophys Res Commun*, **1994**. 201(1): pp. 290-294.

[344] Tummino, P.J., Ferguson, D., Hupe, L., and Hupe, D., "Competitive inhibition of HIV-1 protease by 4-hydroxy-benzopyran-2-ones and by 4-hydroxy-6-phenylpyran-2-ones." *Biochem Biophys Res Commun*, **1994**. 200(3): pp. 1658-1664.

[345] Prasad, J.V.N. Vara, Para, K.S., Tummino, P.J., Ferguson, D., McQuade, T.J., Lunney, E.A., Rapundalo, S.T., Batley, B.L., Hingorani, G., Domagala, J.M., Gracheck, S.J., Bhat, T.N., Liu, B.S., Baldwin, E.T., Erickson, J.W., and Sawyer, T.K., "Nonpeptidic potent HIV-1 protease inhibitors: (4-Hydroxy-6-phenyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)thiomethanes that span P-1- P-2' subsites in a unique mode of active site binding." *J Med Chem*, **1995**. 38(6): pp. 898-905.

[346] Hamilton, H.W., Tait, B.D., Gajda, C., Hagen, S.E., Ferguson, D., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., and Tummino, P.J., "6-Phenyl-6-alkylamido-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: Novel HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(6): pp. 719-724.

[347] Prasad, J.V.N. Vara, Pavlovsky, A., Para, K.S., Ellsworth, E., Tummino, P.J., Nouhan, C., and Ferguson, D., "Nonpeptidic HIV protease inhibitors : 3-(S-benzyl substituted)-4-hydroxy-6-(phenyl substituted)-2H-pyran-2-one with an inverse mode of binding." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(10): pp. 1133-1138.

[348] Prasad, J.V.N. Vara, Lunney, E.A., Ferguson, D., Tummino, P.J., Rubin, J.R., Reyner, E.L., Stewart, B.H., Guttendorf, R.J., Domagala, J.M., Suvorov, L.I., Gulnik, S.V., Topol, I.A., Bhat, T.N., and Erickson, J.W., "HIV protease inhibitors possessing a novel, high-affinity, and achiral P-1'/P-2' ligand with a unique pattern of in vitro resistance. Importance of a conformationally-restricted template in the design of enzyme inhibitors." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117(45): pp. 11070-11074.

- [349] Steinbaugh, B.A., Hamilton, H.W., Prasad, J.V.N. Vara, Para, K.S., Tummino, P.J., Ferguson, D., Lunney, E.A., and Blankley, C.J., "A Topliss tree analysis of the HIV-protease inhibitory activity of 6-phenyl-4-hydroxy-pyran-2-ones." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(10): pp. 1099-1104.
- [350] Hagen, S.E., Prasad, J.V.N. Vara, Boyer, F.E., Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Markoski, L.J., Steinbaugh, B.A., Tait, B.D., Lunney, E.A., Tummino, P.J., Ferguson, D., Hupe, D., Nouhan, C., Gracheck, S.J., Saunders, J.M., and Vanderroest, S., "Synthesis of 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as HIV-1 protease inhibitors: The profound effect of polarity on antiviral activity." *J Med Chem*, **1997**. 40(23): pp. 3707-3711.
- [351] Tait, B.D., Hagen, S., Domagala, J., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Prasad, J.V.N. Vara, Ferguson, D., Graham, N., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P.J., Humblet, C., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., Rubin, J., Gracheck, S.J., Baldwin, E.T., Bhat, T.N., Erickson, J.W., Gulnik, S.V., and Liu, B.S., "4-hydroxy-5,6-dihdropyrones .2. Potent non-peptide inhibitors of HIV protease." *J Med Chem*, **1997**. 40(23): pp. 3781-3792.
- [352] Prasad, J.V.N. Vara, Boyer, F.E., Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hagen, S.E., Markoski, L.J., Tait, B.D., Lunney, E.A., Tummino, P.J., Ferguson, D., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Gracheck, S.J., VanderRoest, S., Saunders, J., Iyer, K., Sinz, M., and Brodfuehrer, J., "Nonpeptidic HIV protease inhibitors: 6-alkyl-5,6-dihdropyran-2-ones possessing achiral 3-(4-amino/carboxamide-2-t-butyl,5-methylphenyl thio) moiety: antiviral activities and pharmacokinetic properties." *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**. 9(11): pp. 1481-6.
- [353] Prasad, J.V.N. Vara, Boyer, F.E., Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Hagen, S.E., Markoski, L.J., Steinbaugh, B.A., Tait, B.D., Humblet, C., Lunney, E.A., Pavlovski, A., Rubin, J.R., Ferguson, D., Graham, N., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P.J., Urumov, A., Zeikus, E., Zeikus, G., Gracheck, S.J., Saunders, J.M., VanderRoest, S., Brodfuehrer, J., Iyer, K., Sinz, M., Gulnik, S.V., and Erickson, J.W., "Nonpeptidic HIV protease inhibitors possessing excellent antiviral activities and therapeutic indices. PD178390: a lead HIV protease inhibitor." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7: pp. 2775-2800.
- [354] Hagen, S.E., Domagala, J., Gajda, C., Lovdahl, M., Tait, B.D., Wise, E., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Urumov, A., Zeikus, G., Zeikus, E., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., Gracheck, S.J., Saunders, J., VanderRoest, S., and Brodfuehrer, J., "4-Hydroxy-5,6-dihdropyrones as inhibitors of HIV protease: the effect of heterocyclic substituents at C-6 on antiviral potency and pharmacokinetic parameters." *J Med Chem*, **2001**. 44(14): pp. 2319-32.
- [355] Boyer, F.E., Prasad, J.V.N. Vara, Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hagen, S.E., Markoski, L.J., Tait, B.D., Lunney, E.A., Palovsky, A., Ferguson, D., Graham, N., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P.J., Urumov, A., Zeikus, E., Zeikus, G., Gracheck, S.J., Sanders, J.M., VanderRoest, S., Brodfuehrer, J., Iyer, K., Sinz, M., and Gulnik, S.V., "5,6-Dihdropyran-2-ones possessing various sulfonyl functionalities: potent nonpeptidic inhibitors of HIV protease." *J Med Chem*, **2000**. 43(5): pp. 843-58.
- [356] Lunney, E.A., Hagen, S.E., Domagala, J.M., Humblet, C., Kosinski, J., Tait, B.D., Warmus, J.S., Wilson, M., Ferguson, D., Hupe, D., Tummino, P.J., Baldwin, E.T., Bhat, T.N., Liu, B.S., and Erickson, J.W., "A novel nonpeptide HIV-1 protease inhibitor: Elucidation of the binding mode and its application in the design of related analogs." *J Med Chem*, **1994**. 37(17): pp. 2664-2677.
- [357] Prasad, J.V.N. Vara, Para, K.S., Lunney, E.A., Ortwine, D.F., Dunbar, J.B., Ferguson, D., Tummino, P.J., Hupe, D., Tait, B.D., Domagala, J.M., Humblet, C., Bhat, T.N., Liu, B.S., Guerin, D.M.A., Baldwin, E.T., Erickson, J.W., and Sawyer, T.K., "Novel series of achiral, low molecular weight, and potent HIV-1 protease inhibitors." *J Am Chem Soc*, **1994**. 116(15): pp. 6989-6990.

- [358] Lam, P.Y.S., Jadhav, P.K., Eyermann, C.J., Hodge, C.N., Ru, Y., Bacheler, L.T., Meek, J.L., Otto, M.J., Rayner, M.M., Wong, Y.N., Chang, C.H., Weber, P.C., Jackson, D.A., Sharpe, T.R., and Erickson-Viitanen, S., "Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors." *Science*, **1994**. 263: pp. 380-384.
- [359] Randad, R.S., Pan, W.X., Gulnik, S.V., Burt, S., and Erickson, J.W., "De novo Design of Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors - Incorporation of Structural Water." *Bioorg Med Chem Lett*, **1994**. 4(10): pp. 1247-1252.
- [360] DeLucca, G.V., Erickson-Viitanen, S., and Lam, P.Y.S., "Cyclic HIV protease inhibitors capable of displacing the active site structural water molecule." *DDT*, **1997**. 2(1): pp. 6-18.
- [361] Kaltenbach III, R.F., Nugiel, D.A., Lam, P.Y.S., Klabe, R.M., and Seitz, S.P., "Stereoisomers of cyclic urea HIV-1 protease inhibitors: synthesis and binding affinities." *J Med Chem*, **1998**. 41: pp. 5113-5117.
- [362] Ala, P.J., DeLoskey, R.J., Huston, E.E., Jadhav, P.K., Lam, P.Y.S., Eyermann, C.J., Hodge, C.N., Schadt, M.C., Lewandowski, F.A., Weber, P.C., McCabe, D.D., Duke, J.L., and Chang, C.-H., "Molecular recognition of cyclic urea HIV-1 protease inhibitors." *J Biol Chem*, **1998**. 273(20): pp. 12325-12331.
- [363] Lam, P.Y.S., Ru, Y., Jadhav, P.K., Aldrich, P.E., DeLucca, G.V., Eyermann, C.J., Chang, C.-H., Emmet, G., Holler, E.R., Daneker, W.F., Li, L., Confalone, P.N., McHugh, R.J., Han, Q., Li, R., Markwalder, J.A., Seitz, S.P., Sharpe, T.R., Bacheler, L.T., Rayner, M.M., Klabe, R.M., Shum, L., Winslow, D.L., Kornhauser, D.M., Jackson, D.A., Erickson-Viitanen, S., and Hodge, C.N., "Cyclic HIV Protease Inhibitors: Synthesis, Conformational Analysis, P2/P2' Structure-Activity Relationship, and Molecular Recognition of Cyclic Ureas." *J Med Chem*, **1996**. 39: pp. 3514-3525.
- [364] Rayner, M.M., Cordova, B.C., Meade, R.P., Aldrich, P.E., Jadhav, P.K., Ru, Y., and Lam, P.Y.S., "DMP 323, a nonpeptide cyclic urea inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) protease, specifically and persistently blocks intracellular processing of HIV gag polyprotein." *Antimicrob Agents Chemother*, **1994**. 38(7): pp. 1635-1640.
- [365] Wilkerson, W.W., Hollis, A.Y., Cheatham, W.W., Lam, G.N., Erickson-Viitanen, S., Bacheler, L., Cordova, B.C., Klabe, R.M., and Meek, J.L., "A Bis-[N-3-(1-Hydroxy-1-Methyl-Ethyl)-Benzyl]-Cyclic Urea as HIV Protease Inhibitor." *Bioorg Med Chem Lett*, **1995**. 5(24): pp. 3027-3032.
- [366] Nugiel, D.A., Jacobs, K., Worley, T., Patel, M., Kaltenbach, R.F., Meyer, D.T., Jadhav, P.K., DeLucca, G.V., Smyser, T.E., Klabe, R.M., Bacheler, L.T., Rayner, M.M., and Seitz, S.P., "Preparation and structure-activity relationship of novel P1/P1'-substituted cyclic urea-based human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors." *J Med Chem*, **1996**. 39(11): pp. 2156-2169.
- [367] Rodgers, J.D., Johnson, B.L., Wang, H., Greenberg, R.A., Erickson-Viitanen, S., Klabe, R.M., Cordova, B.C., Rayner, M.M., Lam, G.N., and Chang, C.-H., "Potent cyclic ureas HIV protease inhibitors with benzofused heterocycles as P2/P2' groups." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(24): pp. 2919-2924.
- [368] Nugiel, D.A., Jacobs, K., Cornelius, L., Chang, C.-H., Jadhav, P.K., Holler, E.R., Klabe, R.M., Bacheler, L.T., Cordova, B., Garber, S., Reid, C., Logue, K.A., Gorey-Feret, L.J., Lam, G.N., Erickson-Viitanen, S., and Seitz, S.P., "Improved P1/P1' Substituents for Cyclic Urea Based HIV-1 Protease Inhibitors: Synthesis, Structure-Activity Relationship, and X-ray Crystal Structure Analysis." *J Med Chem*, **1997**. 40: pp. 1465-1474.

- [369] Debnath, A.K., "Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study on Cyclic Urea Derivatives as HIV-1 Protease Inhibitors: Application of Comparative Molecular Field Analysis." *J Med Chem*, **1999**. 42: pp. 249-259.
- [370] Mardis, K.L., Luo, R., and Gilson, M.K., "Interpreting trends in the binding of cyclic ureas to HIV-1 protease." *J Mol Biol*, **2001**. 309(2): pp. 507-17.
- [371] Hodge, C.N., Aldrich, P.E., Bacheler, L.T., Chang, C.-H., Eyermann, C.J., Garber, S., Grubb, M., Jackson, D.A., Jadhav, P.K., Korant, B., Lam, P.Y.S., Maurin, M.B., Meek, J.L., Otto, M.J., Rayner, M.M., Reid, C., Sharpe, T.R., Shum, L., Winslow, D.L., and Erickson-Viitanen, S., "Improved cyclic urea inhibitor of the HIV-1 protease: synthesis, potency, resistance profile, human pharmacokinetics and X-ray crystal structure of DMP 450." *Curr Biol*, **1996**. 3: pp. 301-314.
- [372] Rodgers, J.D., Johnson, B.L., Wang, H., Erickson-Viitanen, S., Klabe, R.M., Bacheler, L., Cordova, B.C., and Chang, C.-H., "Potent cyclic urea HIV protease inhibitors with 3-aminoindazole P2/P2' groups." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8: pp. 715-720.
- [373] Han, Q., Chang, C.H., Li, R., Ru, Y., Jadhav, P.K., and Lam, P.Y., "Cyclic HIV protease inhibitors: design and synthesis of orally bioavailable, pyrazole P2/P2' cyclic ureas with improved potency." *J Med Chem*, **1998**. 41(12): pp. 2019-28.
- [374] Patel, M., Bacheler, L.T., Rayner, M.M., Cordova, B.C., Klabe, R.M., Erickson-Viitanen, S., and Seitz, S.P., "The synthesis and evaluation of cyclic ureas as HIV protease inhibitors: modifications of the P1/P1' residues." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8: pp. 823-828.
- [375] Wilkerson, W.W., Dax, S., and Cheatham, W.W., "Nonsymmetrically substituted cyclic urea HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **1997**. 40(25): pp. 4079-4088.
- [376] Jadhav, P.K., Ala, P., Woerner, F.J., Chang, C.-H., Garber, S.S., Anton, E.D., and Bacheler, L.T., "Cyclic urea amide: HIV-1 protease inhibitors with low nanomolar potency against both wild type and protease inhibitor resistant mutants of HIV." *J Med Chem*, **1997**. 40: pp. 181-191.
- [377] DeLucca, G.V., Kim, U.T., Liang, J., Cordova, B., Klabe, R.M., Garber, S., Bacheler, L.T., Lam, G.N., Wright, M.R., Logue, K.A., Erickson-Viitanen, S., Ko, S.S., and Trainor, G.L., "Nonsymmetric P2/P2' cyclic urea HIV protease inhibitors. Structure-activity relationship, bioavailability, and resistance profile of monoindazole-substituted P2 analogues." *J Med Chem*, **1998**. 41(13): pp. 2411-2423.
- [378] Patel, M., Kaltenbach, R.F., 3rd, Nugiel, D.A., McHugh, R.J., Jr., Jadhav, P.K., Bacheler, L.T., Cordova, B.C., Klabe, R.M., Erickson-Viitanen, S., Garber, S., Reid, C., and Seitz, S.P., "The synthesis of symmetrical and unsymmetrical P1/P1' cyclic ureas as HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8(9): pp. 1077-82.
- [379] Rodgers, J.D., Lam, P.Y., Johnson, B.L., Wang, H., Li, R., Ru, Y., Ko, S.S., Seitz, S.P., Trainor, G.L., Anderson, P.S., Klabe, R.M., Bacheler, L.T., Cordova, B., Garber, S., Reid, C., Wright, M.R., Chang, C.H., and Erickson-Viitanen, S., "Design and selection of DMP 850 and DMP 851: the next generation of cyclic urea HIV protease inhibitors." *Chem Biol*, **1998**. 5(10): pp. 597-608.
- [380] Kaltenbach, R.F., Patel, M., Waltermire, R.E., Harris, G.D., Stone, B.R., Klabe, R.M., Garber, S., Bacheler, L.T., Cordova, B.C., Logue, K., Wright, M.R., Erickson-Viitanen, S., and Trainor, G.L., "Synthesis, antiviral activity and pharmacokinetics of P1/P1' substituted 3-aminoindazole cyclic urea HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**. 13(4): pp. 605-8.

- [381] Gayathri, P., Pande, V., Sivakumar, R., and Gupta, S.P., "A quantitative structure-activity relationship study on some HIV-1 protease inhibitors using molecular connectivity index." *Bioorg Med Chem*, **2001**. 9(11): pp. 3059-63.
- [382] DeLucca, G.V., Liang, J., and DeLucca, I., "Stereospecific Synthesis, Structure-Activity Relationship, and Oral Bioavailability of Tetrahydropyrimidin-2-one HIV Protease Inhibitors." *J Med Chem*, **1999**. 42: pp. 135-152.
- [383] DeLucca, G.V., Liang, J., Aldrich, P.E., Calabrese, J., Cordova, B., Klabe, R.M., Rayner, M.M., and Chang, C.-H., "Design, synthesis, and evaluation of tetrahydropyrimidinones as an example of a general approach to nonpeptide HIV protease inhibitors." *J Med Chem*, **1997**. 40: pp. 1707-1719.
- [384] Gupta, S.P. and Babu, M.S., "Quantitative structure-activity relationship studies on cyclic cyanoguanidines acting as HIV-1 protease inhibitors." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7(11): pp. 2549-53.
- [385] Jadhav, P.K., Woerner, F.J., Lam, P.Y., Hodge, C.N., Eyermann, C.J., Man, H.W., Daneker, W.F., Bacheler, L.T., Rayner, M.M., Meek, J.L., Erickson-Viitanen, S., Jackson, D.A., Calabrese, J.C., Schadt, M., and Chang, C.H., "Nonpeptide cyclic cyanoguanidines as HIV-1 protease inhibitors: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystal structure studies." *J Med Chem*, **1998**. 41(9): pp. 1446-55.
- [386] Smallheer, J.M. and Seitz, S.P., "Novel bicyclic phosphordiamidate HIV protease inhibitors." *Heterocycles*, **1996**. 43(11): pp. 2367-2376.
- [387] Sham, H.L., Zhao, C., Stewart, K.D., Betebenner, D.A., Lin, S., Park, C.H., Kong, X.-P., Rosenbrook, W.J., Heerin, T., Madigan, D., Vasavanonda, S., Lyons, N., Molla, A., Saldivar, A., Marsh, K.C., McDonald, E., Wideburg, N.E., Denissen, J.F., Robins, T., Kempf, D.J., Plattner, J.J., and Norbeck, D.W., "A novel picomolar inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 protease." *J Med Chem*, **1996**. 39: pp. 392-397.
- [388] Huang, P.P., Randolph, J.T., Klein, L.L., Vasavanonda, S., Dekhtyar, T., Stoll, V.S., and Kempf, D.J., "Synthesis and antiviral activity of P1' arylsulfonamide azacyclic urea HIV protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. 14(15): pp. 4075-4078.
- [389] Hulten, J., Bonham, N.M., Nillroth, U., Hansson, T., Zuccarello, G., Bouzide, A., Aqvist, J., Classon, B., Danielson, U.H., Karlen, A., Kvarnstrom, I., Samuelsson, B., and Hallberg, A., "Cyclic HIV-1 protease inhibitors derived from mannitol: synthesis, inhibitory potencies, and computational predictions of binding affinities." *J Med Chem*, **1997**. 40(6): pp. 885-97.
- [390] Kim, C.U., McGee, L.R., Krawczyk, S.H., Harwood, E., Harada, Y., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Cherrington, J.M., Xiong, S.F., Griffin, L., Cundy, K.C., Lee, A., Yu, B., Gulnik, S., and Erickson, J.W., "New series of potent, orally bioavailable, non-peptidic cyclic sulfones as HIV-1 protease inhibitors." *J Med Chem*, **1996**. 39(18): pp. 3431-3434.
- [391] Schaal, W., Karlsson, A., Ahlsen, G., Lindberg, J., Andersson, H.O., Danielson, U.H., Classon, B., Unge, T., Samuelsson, B., Hulten, J., Hallberg, A., and Karlen, A., "Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of symmetric and nonsymmetric cyclic sulfamide HIV-1 protease inhibitors." *J Med Chem*, **2001**. 44(2): pp. 155-69.
- [392] Hulten, J., Andersson, H.O., Schaal, W., Danielson, H.U., Classon, B., Kvarnstrom, I., Karlen, A., Unge, T., Samuelsson, B., and Hallberg, A., "Inhibitors of the C(2)-symmetric HIV-1 protease: nonsymmetric binding of a symmetric cyclic sulfamide with ketoxime groups in the P2/P2' side chains." *J Med Chem*, **1999**. 42(20): pp. 4054-61.

- [393] Backbro, K., Lowgren, S., Osterlund, K., Atepo, J., Unge, T., Hulten, J., Bonham, N.M., Schaal, W., Karlen, A., and Hallberg, A., "Unexpected binding mode of a cyclic sulfamide HIV-1 protease inhibitor." *J Med Chem*, **1997**. 40(6): pp. 898-902.
- [394] Hilgeroth, A., Billich, A., and Lilie, H., "Synthesis and biological evaluation of first N-alkyl syn dimeric 4-aryl- 1,4-dihydropyridines as competitive HIV-1 protease inhibitors." *Eur J Med Chem*, **2001**. 36(4): pp. 367-74.
- [395] Hilgeroth, A., Dressler, C., Neuhoff, S., Spahn-Langguth, H., and Langguth, P., "Dimeric 4-aryl-1,4-dihydropyridines as novel HIV-1 protease inhibitors-- affinities to intestinal P-glycoprotein." *Pharmazie*, **2000**. 55(10): pp. 784-5.
- [396] Hilgeroth, A. and Langner, A., "First bioanalytical evaluation of nonpeptidic cage dimeric HIV-1 protease inhibitor N-benzyl 4-aryl-1,4-dihydropyridine H17: biotransformation and toxicity on Hep G2 cells." *Arch Pharm (Weinheim)*, **2000**. 333(1): pp. 32-4.
- [397] Hilgeroth, A. and Langner, A., "Plasma protein binding properties of dimeric 4-aryl-1,4-dihydropyridines as novel non peptidic HIV-1 protease inhibitors." *Pharmazie*, **2000**. 55(7): pp. 542-3.
- [398] Hilgeroth, A. and Lilie, H., "Structure-activity relationships of first bishydroxymethyl-substituted cage dimeric 4-aryl-1,4-dihydropyridines as HIV-1 protease inhibitors." *Eur J Med Chem*, **2003**. 38(5): pp. 495-9.
- [399] Hilgeroth, A., Tykarska, E., and Jaskolski, M., "Crystal structure of a novel synthetic inhibitor of HIV-1 protease." *J Mol Struct*, **2002**. 605: pp. 63-70.
- [400] Hilgeroth, A., Wiese, M., and Billich, A., "Synthesis and biological evaluation of the first N-alkyl cage dimeric 4-aryl-1,4-dihydropyridines as novel nonpeptidic HIV-1 protease inhibitors." *J Med Chem*, **1999**. 42(22): pp. 4729-32.
- [401] Ro, S., Baek, S.-G., Lee, B., Park, C., Choy, N., Lee, C.S., Son, Y.C., Choi, H., Koh, J.S., Yoon, H., Kim, S.C., and Ok, J.H., "NMR and topochemical studies of peptidomimetic HIV-1 protease inhibitors containing a cis-epoxide amide isostere." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. 8(18): pp. 2423-2426.
- [402] Choy, N., Choi, H.-i., Jung, W.H., Kim, C.R., Yoon, H., Kim, S.C., Lee, T.G., and Koh, J.S., "Synthesis of irreversible HIV-1 protease inhibitors containing sulfonamide and sulfone as amide bond isostere." *Bioorg Med Chem Lett*, **1997**. 7(20): pp. 2635-2638.
- [403] Lee, C.S., Choy, N., Park, C., Choi, H., Son, Y.C., Kim, S., Ok, J.H., Yoon, H., and Kim, S.C., "Design, synthesis, and characterization of dipeptide isostere containing cis-epoxide for the irreversible inactivation of HIV protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **1996**. 6(6): pp. 589-594.
- [404] Lee, C.S., Choy, N., Son, Y.C., Park, C., Choi, H., Moon, K.Y., Jung, W.H., Kim, S.C., and Yoon, H., "A key intermediate for irreversible HIV protease inhibitors : synthesis of optically pure N-Cbz-5S-amino-6-phenyl-hex-3Z-enoic acid." *Bull Korean Chem Soc*, **1996**. 17(3): pp. 294-295.
- [405] Park, C., Koh, J.S., Son, Y.C., Choi, H.-i., Lee, C.S., Choy, N., Moon, K.Y., Jung, W.H., Kim, S.C., and Yoon, H., "Rational design of irreversible, pseudo-C2-symmetric HIV-1 protease inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **1995**. 5(16): pp. 1843-1848.
- [406] Rose, R.B., Rose, J.R., Salto, R., Craik, C.S., and Stroud, R.M., "Structure of the protease from simian immunodeficiency virus: complex with an irreversible nonpeptide inhibitor." *Biochemistry*, **1993**. 32(46): pp. 12498-12507.

- [407] Blumenstein, J.J., Copeland, T.D., Oroszlan, S., and Michejda, C.J., "Synthetic non-peptide inhibitors of HIV protease." *Biochem Biophys Res Comm*, **1989**. 163(2): pp. 980-987.
- [408] Salto, R., Babé, L.M., Li, J., Rosé, J.R., Yu, Z., Burlingame, A., DeVoss, J.J., Sui, Z., Ortiz de Montellano, P., and Craik, C.S., "In vitro characterization of nonpeptide irreversible inhibitors of HIV protease." *J Biol Chem*, **1994**. 269(14): pp. 10691-10698.
- [409] Yu, Z., Caldera, P., McPhee, F., DeVoss, J.J., Jones, P.R., Burlingame, A.L., Kuntz, I.D., Craik, C.S., and Ortiz de Montellano, P.R., "Irreversible inhibition of the HIV-1 protease: targeting alkylating agents to the catalytic aspartate groups." *J Am Chem Soc*, **1996**. 118: pp. 5846-5856.
- [410] Mavri, J., "Irreversible inhibition of the HIV-1 protease : a theoretical study." *Int J Quant Chem*, **1998**. 69: pp. 753-759.
- [411] Babé, L.M., Pichuanes, S., and Craik, C.S., "Inhibition of HIV Protease Activity by Heterodimer Formation." *Biochemistry*, **1991**. 30: pp. 106-111.
- [412] Zhang, Z.-Y., Poorman, R.A., Maggiora, L.L., Heinrickson, R.L., and Kezdy, F.J., "Dissociative Inhibition of Dimeric Enzymes. Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide." *J Biol Chem*, **1991**. 266(24): pp. 15591-15594.
- [413] Schramm, H.J., Nakashima, H., Schramm, W., Wakayama, H., and Yamamoto, N., "HIV-1 reproduction is inhibited by peptides derived from the N- and C-termini of HIV-1 protease." *Bioch Biophys Res Comm*, **1991**. 179(2): pp. 847-851.
- [414] Schramm, H.J., Breipohl, G., Hansen, J., Henke, S., Jaeger, E., Meichsner, C., Riess, G., Ruppert, D., Rücknagel, K.-P., Schäfer, W., and Schramm, W., "Inhibition of HIV-1 protease by short peptides derived from the terminal segments of the protease." *Biochem Biophys Res Commun*, **1992**. 184(2): pp. 980-985.
- [415] Babé, L.M., Rosé, J., and Craik, C.S., "Synthetic interface peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases." *Protein Sc*, **1992**. 1: pp. 1244-1253.
- [416] Franciskovich, J., Houseman, K., Mueller, R., and Chmielewski, J., "A systematic evaluation of the inhibition of HIV-1 protease by its C- and N-terminal peptides." *Bioorg Med Chem Lett*, **1993**. 3(4): pp. 765-768.
- [417] Schramm, H.J., Billig, A., Jaeger, E., Rücknagel, K.-P., Arnold, G., and Schramm, W., "The inhibition of HIV-1 protease by interface peptides." *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**. 194(2): pp. 595-600.
- [418] Schramm, H.J., Boetzel, J., Buttner, J., Fritsche, E., Gohring, W., Jaeger, E., König, S., Thumfart, O., Wenger, T., Nagel, N.E., and Schramm, W., "The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'." *Antiviral Res*, **1996**. 30(2-3): pp. 155-170.
- [419] Misumi, S., Kudo, A., Azuma, R., Tomonaga, M., Furuishi, K., and Shoji, S., "The p2(gag) peptide, AEAMSQVTNTATIM, processed from HIV-1 Pr55(gag) was found to be a suicide inhibitor of HIV-1 protease." *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**. 241(2): pp. 275-280.
- [420] Ast, O., Jentsch, K.D., Schramm, H.J., Hunsmann, G., Luke, W., and Petry, H., "A rapid and sensitive bacterial assay to determine the inhibitory effect of 'interface' peptides on HIV-1 protease co-expressed in Escherichia coli." *J Virol Methods*, **1998**. 71(1): pp. 77-85.
- [421] Park, S.H. and Raines, R.T., "Genetic selection for dissociative inhibitors of designated protein- protein interactions." *Nat Biotechnol*, **2000**. 18(8): pp. 847-51.

- [422] Caflisch, A., Schramm, H.J., and Karplus, M., "Design of dimerization inhibitors of HIV-1 aspartic proteinase: a computer-based combinatorial approach." *J Comput Aided Mol Des*, **2000**. *14*(2): pp. 161-79.
- [423] Schramm, H.J., de Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., Büttner, J., Dick, A., and Schramm, W., "Lipopeptides as dimerization inhibitors." *Biol Chem*, **1999**. *380*: pp. 593-596.
- [424] Dumond, J., Boggetto, N., Schramm, H.J., Schramm, W., Takahashi, M., and Reboud-Ravaux, M., "Thyroxine-derivatives of lipopeptides: bifunctional dimerization inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease." *Biochem Pharmacol*, **2003**. *65*(7): pp. 1097-102.
- [425] Breccia, P., Boggetto, N., Perez-Fernandez, R., Van Gool, M., Takahashi, M., Rene, L., Prados, P., Badet, B., Reboud-Ravaux, M., and De Mendoza, J., "Dimerization Inhibitors of HIV-1 Protease Based on a Bicyclic Guanidinium Subunit." *J Med Chem*, **2003**. *46*(24): pp. 5196-5207.
- [426] Arnold, G., Poppinga, K., Schramm, H.J., Bell, M., Thumfart, O., Wenger, T., and Schramm, W., *Inhibition of HIV-1 protease by bifunctional interface peptides*, in *Peptide 1994*, Maia, H.L.S., Editor. **1994**, ESCOM: Leiden. pp. 345-346.
- [427] Shultz, M.D., Bowman, M.J., Ham, Y.-W., Zhao, X., Tora, G., and Chmielewski, J., "Small-molecule inhibitors of HIV-1 protease dimerization derived from cross-linked interfacial peptides." *Angew Chem Int Ed Engl*, **2000**. *39*(15): pp. 2710-2713.
- [428] Shultz, M.D. and Chmielewski, J., "Probing the role of interfacial residues in a dimerization inhibitor of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**. *9*(16): pp. 2431-6.
- [429] Zutshi, R., Shultz, M.D., Ulysse, L.G., Lutgring, R., Bishop, P., Schweitzer, B., Vogel, K., Franciskovich, J., Wilson, M., and Chmielewski, J., "Inhibiting the dimerization of HIV-1 protease." *Synlett*, **1998**: pp. 1040-1044.
- [430] Shultz, M.D. and Chmielewski, J., "Hydrophobicity versus activity in crosslinked interfacial peptide inhibitors of HIV-1 protease." *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**. *8*(23): pp. 3881-3996.
- [431] Zutshi, R., Franciskovich, J., Shultz, M., Schweitzer, B., Bishop, P., Wilson, M., and Chmielewski, J., "Targeting the dimerization interface of HIV-1 protease: inhibition with cross-linked interfacial peptides." *J Am Chem Soc*, **1997**. *119*: pp. 4841-4845.
- [432] Bowman, M.J. and Chmielewski, J., "Crucial amides for dimerization inhibitors of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. *14*(6): pp. 1395-1398.
- [433] Hwang, Y.S. and Chmielewski, J., "A unidirectional crosslinking strategy for HIV-1 protease dimerization inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**. *14*(16): pp. 4297-4300.
- [434] Ulysse, L.G. and Chmielewski, J., "Restricting the flexibility of crosslinked, interfacial peptide inhibitors of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**. *8*(22): pp. 3281-6.
- [435] Bouras, A., Boggetto, N., Benatalah, Z., de Rosny, E., Sicsic, S., and Reboud-Ravaux, M., "Design, synthesis and evaluation of conformationally constrained tongs, new inhibitors of HIV-1 protease dimerization." *J Med Chem*, **1999**. *42*: pp. 957-962.
- [436] Song, M., Rajesh, S., Hayashi, Y., and Kiso, Y., "Design and synthesis of new inhibitors of HIV-1 protease dimerization with conformationally constrained templates." *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**. *11*(18): pp. 2465-8.
- [437] Fan, X., Flentke, G.R., and Rich, D.H., "Inhibition of HIV-1 protease by a subunit of didemnaketal A." *J Am Chem Soc*, **1998**. *120*: pp. 8893-8894.

- [438] Schramm, H.J., Quéré, L., Büttner, J., Wenger, T., Dick, A., and Schramm, W., "Steroids as possible inhibitors of HIV-1 protease." *Aids*, **1998**. 12(6): pp. 682-685.
- [439] Quéré, L., Wenger, T., and Schramm, H.J., "Triterpenes as potential dimerization inhibitors of HIV-1 Protease." *Biochem Biophys Res Commun*, **1996**. 227: pp. 484-488.
- [440] Zutshi, R. and Chmielewski, J., "Targeting the dimerization interface for irreversible inhibition of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**. 10(17): pp. 1901-3.
- [441] De Voss, J.J., Sui, Z., DeCamp, D.L., Salto, R., Babe, L.M., Craig, C.S., and Ortiz de Montellano, P.R., "Haloperidol-based irreversible inhibitors of the HIV-1 and HIV-2 proteases." *J Med Chem*, **1994**. 37: pp. 665-673.
- [442] Davis, D.A., Dorsey, K., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Kaufman, J., Fales, H.M., and Levine, R.L., "Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification." *Biochemistry*, **1996**. 35(7): pp. 2482-2488.
- [443] Rozzelle, J.E., Dauber, D.S., Todd, S., Kelley, R., and Craik, C.S., "Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. Characterization of designed heterodimers." *J Biol Chem*, **2000**. 275(10): pp. 7080-6.
- [444] McPhee, F., Good, A., Kuntz, I.D., and Craik, C.S., "Engineering human immunodeficiency virus 1 protease heterodimers as macromolecular inhibitors of viral maturation." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**. 93: pp. 11477-11481.
- [445] Babé, L.M., Rosé, J., and Craik, C.S., "Trans-dominant inhibitory human immunodeficiency virus type 1 protease monomers prevent protease activation and virion maturation." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**. 92: pp. 10069-10073.
- [446] Todd, S., Anderson, C., Jolly, D.J., and Craik, C.S., "HIV protease as a target for retrovirus vector-mediated gene therapy." *Biochim Biophys Acta*, **2000**. 1477(1-2): pp. 168-88.
- [447] Stadtman, E.R. and Oliver, C.N., "Metal-catalyzed Oxidation of Proteins." *J Biol Chem*, **1991**. 266(4): pp. 2005-2008.
- [448] Woon, T.C., Brinkworth, R.I., and Fairlie, D.P., "Inhibition of HIV-1 proteinase by metal ions." *Int J Biochem*, **1992**. 24(6): pp. 911-914.
- [449] Zhang, Z.-Y., Reardon, I.M., Hui, J.O., O'Connell, K.L., Poorman, R.A., Tomasselli, A.G., and Heinrikson, R.L., "Zinc inhibition of renin and the protease from the human immunodeficiency virus type 1." *Biochemistry*, **1991**. 30(36): pp. 8717-8721.
- [450] Karlström, A.R.K. and Levine, R.L., "Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependant and cysteine-independent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**. 88(13): pp. 5552-5556.
- [451] Karlström, A.R., Shames, B.D., and Levine, R.L., "Reactivity of cysteine residues in the protease from human immunodeficiency virus: identification of a surface-exposed region which affects enzyme function." *Arch Biochem Biophys*, **1993**. 304(1): pp. 163-169.
- [452] D'Ettorre, C. and Levine, R.L., "Reactivity of cysteine-67 of the human immunodeficiency virus-1 protease: Studies on a peptide spanning residues 59 to 75." *Arch Biochem Biophys*, **1994**. 313(1): pp. 71-76.
- [453] Davis, D.A., Yusa, K., Gillim, L.A., Newcombe, F.M., Mitsuya, H., and Yarchoan, R., "Conserved cysteines of the human immunodeficiency virus type I protease are involved in regulation

of polyprotein processing and viral maturation of immature virions." *J Virol*, **1999**. 73(2): pp. 1156-1164.

[454] Danielson, H., Lindgren, M.T., Markgren, P.-O., and Nillroth, U., "Investigation of an allosteric site of HIV-1 proteinase involved in inhibition by Cu²⁺." *Adv Exp Med Biol*, **1998**. 436: pp. 99-103.

[455] Conato, C., Gavioli, R., Guerrini, R., Kozlowski, H., Mlynarz, P., Pasti, C., Pulidori, F., and Remelli, M., "Copper complexes of glycyl-histidyl-lysine and two of its synthetic analogues: chemical behaviour and biological activity." *Biochim Biophys Acta*, **2001**. 1526(2): pp. 199-210.

[456] Pickart, L. and Lovejoy, S., "Biological activity of human plasma copper-binding growth factor glycyl- L-histidyl-L-lysine." *Methods Enzymol*, **1987**. 147: pp. 314-28.

[457] Dash, C. and Rao, M., "Interactions of a novel inhibitor from an extremophilic *Bacillus* sp. with HIV-1 protease: implications for the mechanism of inactivation." *J Biol Chem*, **2001**. 276(4): pp. 2487-93.

[458] Lescar, J., Stouracova, R., Riottot, M.M., Chitarra, V., Brynda, J., Fabry, M., Horejsi, M., Sedlacek, J., and Bentley, G.A., "Preliminary crystallographic studies of an anti-HIV-1 protease antibody that inhibits enzyme activity." *Protein Sci*, **1996**. 5(5): pp. 966-8.

[459] Lescar, J., Stouracova, R., Riottot, M.M., Chitarra, V., Brynda, J., Fabry, M., Horejsi, M., Sedlacek, J., and Bentley, G.A., "Three-dimensional structure of an Fab-peptide complex: structural basis of HIV-1 protease inhibition by a monoclonal antibody." *J Mol Biol*, **1997**. 267(5): pp. 1207-1222.

[460] Lebon, F. and Ledecq, M., "Approaches to the Design of Effective HIV-1 Protease Inhibitors." *Curr Med Chem*, **2000**. 7: pp. 455-477.

[461] Boggetto, N. and Reboud-Ravaux, M., "Dimerization inhibitors of HIV-1 protease." *Biol Chem*, **2002**. 383(9): pp. 1321-1324.

[462] Turner, S.R., "HIV protease inhibitors - The next generation." *Curr Med Chem - Anti-Infective Agents*, **2002**. 1: pp. 141-162.

[463] Swanstrom, R. and Eron, J., "Human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors: therapeutic successes and failures, suppression and resistance." *Pharmacol Ther*, **2000**. 86(2): pp. 145-70.

[464] Tomasselli, A.G. and Heinrikson, R.L., "Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective." *Biochim Biophys Acta*, **2000**. 1477(1-2): pp. 189-214.

[465] Molla, A., Granneman, G.R., Sun, E., and Kempf, D.J., "Recent developments in HIV protease inhibitor therapy." *Antiviral Res*, **1998**. 39(1): pp. 1-23.

[466] Flexner, C., "HIV-protease inhibitors." *New Eng J Med*, **1998**. 338(18): pp. 1281-1292.

[467] Geller, M., Trylska, J., and Antosiewicz, J., *HIV-1 protease and its inhibitors*, in *Theoretical and computational methods in genome research*, Suhai, S., Editor. **1997**, Plenum Press: New-York and London. pp. 237-254.

[468] Chrusciel, R.A. and Romines, K.R., "Recent developments in HIV protease inhibitor research." *Exp Opin Ther Patents*, **1997**. 7(2): pp. 111-121.

- [469] Lin, J.H., "Human immunodeficiency virus protease inhibitors. From drug design to clinical studies." *Adv Drug Deliv Rev*, **1997**. 27(2-3): pp. 215-233.
- [470] Vacca, J.P. and Condra, J.H., "Clinically effective HIV-1 protease inhibitors." *DDT*, **1997**. 2(7): pp. 261-1997.
- [471] Jones, P.S., "Strategies for antiviral drug discovery." *Antivir Chem Chemother*, **1998**. 9(4): pp. 283-302.
- [472] Sluis-Cremer, N. and Tachedjian, G., "Modulation of the oligomeric structures of HIV-1 retroviral enzymes by synthetic peptides and small molecules." *Eur J Biochem*, **2002**. 269(21): pp. 5103-11.
- [473] Zutshi, R., Brickner, M., and Chmielewski, J., "Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces." *Curr Opin Chem Biol*, **1998**. 2(1): pp. 62-6.
- [474] Roberts, N.A., Craig, J.C., and Sheldon, J., "Resistance and cross-resistance with saquinavir and other HIV protease inhibitors: theory and practice." *Aids*, **1998**. 12(5): pp. 453-460.
- [475] Condra, J.H., "Resistance to HIV protease inhibitors." *Haemophilia*, **1998**. 4(4): pp. 610-5.
- [476] Acosta, E.P., Kakuda, T.N., Brundage, R.C., Anderson, P.L., and Fletcher, C.V., "Pharmacodynamics of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors." *Clin Infect Dis*, **2000**. 30 Suppl 2: pp. S151-9.
- [477] Li, L.Y., Stewart, B.H., and Fleisher, D., "Oral delivery of HIV-protease inhibitors." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **2000**. 17(2): pp. 73-99.
- [478] Aungst, B.J., "P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs." *Adv Drug Deliv Rev*, **1999**. 39(1-3): pp. 105-116.
- [479] Li, X. and Chan, W.K., "Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents." *Adv Drug Deliv Rev*, **1999**. 39(1-3): pp. 81-103.
- [480] Williams, G.C. and Sinko, P.J., "Oral absorption of the HIV protease inhibitors: a current update." *Adv Drug Deliv Rev*, **1999**. 39(1-3): pp. 211-238.
- [481] Hruz, P.W., Murata, H., and Mueckler, M., "Adverse metabolic consequences of HIV protease inhibitor therapy: the search for a central mechanism." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2001**. 280(4): pp. E549-53.
- [482] Graham, N.M., "Metabolic disorders among HIV-infected patients treated with protease inhibitors: a review." *J Acquir Immune Defic Syndr*, **2000**. 25 Suppl 1: pp. S4-11.
- [483] Lebon, F., de Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., and Durant, F., "de novo Drug Design of a New Copper Chelate Molecule acting as HIV-1 Protease Inhibitor." *Eur J Med Chem*, **1998**. 33: pp. 733-737.
- [484] Desjarlais, R.L., Seibel, G.L., Kuntz, I.D., Furth, P.S., Alvarez, J.C., Ortiz de Montellano, P.R., DeCamp, D.L., Babé, L.M., and Craik, C.S., "Structure-based design of nonpeptide inhibitors specific for the human immunodeficiency virus 1 protease." *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**. 87: pp. 6644-6648.
- [485] Rutenberg, E., Fauman, E.B., Keenan, R.J., Fong, S., Furth, P.S., Ortiz de Montellano, P.R., Meng, E., Kuntz, I.D., DeCamp, D.L., Salto, A., Rosé, J.R., Craik, C.S., and Stroud, R.M., "Structure

of a non-peptidique inhibitor complexed with HIV-1 protease." *J Biol Chem*, **1993**. 268(21): pp. 15343-15346.

[486] Lee, K.H., McPhee, F., Devoss, J.J., Craik, C.S., and Ortiz de Montellano, P.R., "Nonpeptide HIV protease inhibitors. Differential introduction of alkylamino groups into the two aryl rings of haloperidol." *J Org Chem*, **1994**. 59(21): pp. 6194-6199.

[487] Rose, J.R. and Craik, C.S., "Structure-assisted design of nonpeptide human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors." *Amer J Respir Crit Care Med*, **1994**. 150(6 Suppl.): pp. S176-S182.

[488] Rutenber, E.E., De Voss, J.J., Hoffman, L., Stroud, R.M., Lee, K.H., Alvarez, J., McPhee, F., Craik, C.S., and Ortiz de Montellano, P.R., "The discovery, characterization and crystallographically determined binding mode of a FMOC-containing inhibitor of HIV-1 protease." *Bioorg Med Chem*, **1997**. 5(7): pp. 1311-1320.

[489] Castro, I., Faus, J., Julve, M., Amigo, J.M., Sletten, J., and Debaerdemaeker, T., "Copper(II) - assisted hydrolysis of 2,4,6,-tris(2-pyridyl)- 1,3,5-triazine. Part3. Crystal structures of diaqua [bis (2 - pyridylcarbonyl) amido] copper (II) nitrate dihydrate and aquabis (pyridine-2-carboxamide) copper (II) nitrate monohydrate." *J Chem Soc, Dalton Trans*, **1990**: pp. 891-897.

[490] Halpern, J. and Raymond, K.N., "At the interface of inorganic chemistry and biology." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3562.

[491] Gray, H.B., "Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3563-3568.

[492] Lehnert, N., George, S.D., and Solomon, E.I., "Recent advances in bioinorganic spectroscopy." *Curr Opin Chem Biol*, **2001**. 5(2): pp. 176-87.

[493] Hoffman, B.M., "Electron-nuclear double resonance spectroscopy (and electron spin-echo envelope modulation spectroscopy) in bioinorganic chemistry." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3575-3578.

[494] Holm, R.H., Kennepohl, P., and Solomon, E.I., "Structural and functional aspects of metal sites in biology." *Chem Rev*, **1996**. 96: pp. 2239-2314.

[495] Solomon, E.I., Decker, A., and Lehnert, N., "Non-heme iron enzymes: contrasts to heme catalysis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3589-3594.

[496] Groves, J.T., "The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3569-3574.

[497] O'Halloran, T.V., "Transition metals in control of gene expression." *Science*, **1993**. 261(5122): pp. 715-25.

[498] Burdette, S.C. and Lippard, S.J., "Meeting of the minds: metalloneurochemistry." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3605-3610.

[499] Baker, H.M., Anderson, B.F., and Baker, E.N., "Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3579-3583.

[500] Raymond, K.N., Dertz, E.A., and Kim, S.S., "Enterobactin: an archetype for microbial iron transport." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3584-3588.

- [501] Bertini, I. and Rosato, A., "Bioinorganic chemistry in the postgenomic era." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3601-3604.
- [502] Klinman, J.P., "Mechanisms whereby mononuclear copper proteins functionalize organic substrate." *Chem Rev*, **1996**. 96: pp. 2541-2561.
- [503] Solomon, E.I., Sundaram, U.M., and Machonkin, T.E., "Multicopper oxidases and oxygenase." *Chem Rev*, **1996**. 96: pp. 2563-2605.
- [504] Uauy, R., Olivares, M., and Gonzalez, M., "Essentiality of copper in humans." *Am J Clin Nutr*, **1998**. 67(5 Suppl.): pp. S952-S959.
- [505] Miller, A.-F., "Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills." *Curr Opin Chem Biol*, **2004**. 8(2): pp. 162-168.
- [506] Puig, S. and Thiele, D.J., "Molecular mechanisms of copper uptake and distribution." *Curr Opin Chem Biol*, **2002**. 6: pp. 171-180.
- [507] O'Halloran, T.V. and Culotta, V.C., "Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions." *J Biol Chem*, **2000**. 275(33): pp. 25057-60.
- [508] Rosenzweig, A.C. and O'Halloran, T.V., "Structure and chemistry of the copper chaperone proteins." *Curr Opin Chem Biol*, **2000**. 4(2): pp. 140-7.
- [509] Harrison, M.D., Jones, C.E., and Dameron, C.T., "Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties." *J Biol Inorg Chem*, **1999**. 4(2): pp. 145-153.
- [510] Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., and O'Halloran, T.V., "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase." *Science*, **1999**. 284(5415): pp. 805-8.
- [511] Malmstrom, B.G. and Leckner, J., "The chemical biology of copper." *Curr Opin Chem Biol*, **1998**. 2(2): pp. 286-292.
- [512] Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V.C., Penner-Hahn, J.E., and O'Halloran, T.V., "Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1." *Science*, **1997**. 278(5339): pp. 853-6.
- [513] Valentine, J.S. and Gralla, E.B., "Delivering copper inside yeast and human cells." *Science*, **1997**. 278(5339): pp. 817-818.
- [514] Lee, J.Y., Prohaska, J.R., and Thiele, D.J., "Essential role for mammalian copper transproter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**. 98(12): pp. 6842-6847.
- [515] Nittis, T., George, G., and Winge, D.R., "Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein." *J Biol Chem*, **2001**. 276(45): pp. 42520-42526.
- [516] Wong, P.C., Waggoner, D., Subramaniam, J.R., Tessarollo, L., Bartnikas, T.B., Culotta, V.C., Price, D.L., Rothstein, J., and Gitlin, J.D., "Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**. 97(6): pp. 2886-2891.
- [517] Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., and Bonvin, A.M.J.J., "A Docking Approach to the Study of Copper Trafficking Proteins: Interaction between Metallochaperones and Soluble Domains of Copper ATPases." *Structure*, **2004**. 12(4): pp. 669-676.

- [518] Brewer, G.J., "Copper in medicine." *Curr Opin Chem Biol*, **2003**. 7: pp. 207-212.
- [519] Sarkar, B., "Treatment of Wilson and Menkes diseases." *Chem Rev*, **1999**. 99(9): pp. 2535-2544.
- [520] Bush, A.I., "Metals and neuroscience." *Curr Opin Chem Biol*, **2000**. 4(2): pp. 184-91.
- [521] Sayre, L.M., Perry, G., Atwood, C.S., and Smith, M.A., "The role of metals in neurodegenerative diseases." *Cell Mol Biol*, **2000**. 46(4): pp. 731-41.
- [522] Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., and Martins, R.N., "Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β ." *Brain Res Rev*, **2003**. 43(1): pp. 1-16.
- [523] Barnham, K.J., McKinstry, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parkers, M.W., and Cappai, R., "Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain." *J Biol Chem*, **2003**. 278(19): pp. 17401-17407.
- [524] Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., and Bush, A.I., "Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid." *J Biol Chem*, **2002**. 277(43): pp. 40302-40308.
- [525] Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J., "Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits." *J Biol Chem*, **2001**. 276(23): pp. 20466-73.
- [526] Lehmann, S., "Metal ions and prion disease." *Curr Opin Chem Biol*, **2002**. 6: pp. 187-192.
- [527] Quaglio, E., Chiesa, R., and Harris, D.A., "Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform." *J Biol Chem*, **2001**. 276(14): pp. 11432-8.
- [528] Qin, K., Yang, D.S., Yang, Y., Chishti, M.A., Meng, L.J., Kretschmar, H.A., Yip, C.M., Fraser, P.E., and Westaway, D., "Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation." *J Biol Chem*, **2000**. 275(25): pp. 19121-31.
- [529] Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., and Dyson, H.J., "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**. 96(5): pp. 2042-7.
- [530] Stockel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B., "Prion protein selectively binds copper(II) ions." *Biochemistry*, **1998**. 37(20): pp. 7185-7193.
- [531] Pappalardo, G., Impellizzeri, G., and Campagna, T., "Copper(II) binding of prion protein's octarepeat model peptides." *Inorg Chim Acta*, **2004**. 357(1): pp. 185-194.
- [532] Valentine, J.S. and Hart, P.J., "Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3617-3622.
- [533] Sadler, P.J., *Inorganic chemistry and drug design*, in *Advances in inorganic chemistry*. **1991**, Academic Press, Inc. pp. 1-49.

- [534] Guo, Z. and Sadler, P.J., "Metals in medicine." *Angew Chem Int Ed Engl*, **1999**. 38(11): pp. 1512-1531.
- [535] Schwietert, C.W. and McCue, J.P., "Coordination compounds in medicinal chemistry." *Coord Chem Rev*, **1999**. 184: pp 67-89.
- [536] Orvig, C. and Abrams, M.J., "Medicinal inorganic chemistry : introduction." *Chem Rev*, **1999**. 99(9): pp. 2201-2203.
- [537] Kelland, L.R., *Cisplatin-based anticancer agents*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 109-123.
- [538] Farrell, N. and Spinelli, S., *Dinuclear and trinuclear platinum anticancer agents*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 124-134.
- [539] Zhang, C.X. and Lippard, S.J., "New metal complexes as potential therapeutics." *Curr Opin Chem Biol*, **2003**. 7: pp. 1-9.
- [540] Reedijk, J., "New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(7): pp. 3611-3616.
- [541] Sundquist, W.I. and Lippard, S.J., "The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA." *Coord Chem Rev*, **1990**. 100: pp. 293-322.
- [542] Hall, M.D. and Hambley, T.W., "Platinum(IV) antitumor compounds: their bioinorganic chemistry." *Coord Chem Rev*, **2002**. 232: pp. 49-67.
- [543] Clarke, M.J., "Ruthenium metallopharmaceuticals." *Coord Chem Rev*, **2002**. 232: pp. 69-93.
- [544] Shaw III, C.F., *Gold complexes with anti-arthritic, anti-tumour and anti-HIV activity*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 26-57.
- [545] Sadler, P.J., Li, H., and Sun, H., "Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth." *Coord Chem Rev*, **1999**. 185-186: pp. 689-709.
- [546] Birch, N.J., *Biomedical uses of lithium*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 11-25.
- [547] Riley, D.P., "Functional Mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents." *Chem Rev*, **1999**. 99(9): pp. 2573-2587.
- [548] Weiss, R.H. and Riley, D.P., *Therapeutic aspects of Manganese(II) superoxide dismutase*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 77-92.
- [549] Day, B.J., "Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics." *DDT*, **2004**. 9(13): pp. 557-566.
- [550] Brichard, S.M. and Henquin, J.-C., "The role of vanadium in the management of diabetes." *TiPS*, **1995**. 16: pp. 265-270.
- [551] Orvig, C., Thompson, K.H., Cam, M.C., and McNeill, J.H., *Vanadium compounds as possible insulin modifiers*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 93-108.

- [552] Willsky, G.R., Goldfine, A.B., Kostyniak, P.J., McNeill, J.H., Yang, L.Q., Khan, H.R., and Crans, D.C., "Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV)." *J Inorg Biochem*, **2001**. 85(1): p. 33-42.
- [553] Sakurai, H., Kojima, Y., Yoshikawa, Y., Kawabe, K., and Yasui, H., "Antidiabetic vanadium (IV) and zinc (II) complexes." *Coord Chem Rev*, **2002**. 226: pp. 187-198.
- [554] Louie, A.Y. and Meade, T.J., "Metal complexes as enzyme inhibitors." *Chem Rev*, **1999**. 99(9): pp. 2711-2734.
- [555] Beckett, R.P., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Huxley, P., and Whittaker, M., "Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research." *DDT*, **1996**. 1(1): pp. 16-26.
- [556] Pikul, S., McDow Dunham, K.L., Almstead, N.G., B., D., Natchus, M.G., Anastasio, M.V., McPhail, S.J., Snider, C.E., Taiwo, Y.O., Chen, L., Dunaway, C.M., Gu, F., and Mielsing, G.E., "Design and Synthesis of Phosphinamide-Based Hydroxamic Acids as Inhibitors of Matrix Metalloproteinases." *J Med Chem*, **1999**. 42: pp. 87-94.
- [557] Katz, B.A., Clark, J.M., Finer-Moore, J.S., Jenkins, T.E., Johnson, C.R., Ross, M.J., Luong, C., Moore, W.R., and Stroud, R.M., "Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors." *Nature*, **1998**. 391(5 february): pp. 608-612.
- [558] Janc, J.W., Clark, J.M., Warne, R.L., Elrod, K.C., Katz, B.A., and Moore, W.R., "A novel approach to serine protease inhibition: kinetic characterisation of inhibitors whose potencies and selectivities are dramatically enhanced by zinc(II)." *Biochemistry*, **2000**. 39(16): pp. 4792-4800.
- [559] Takeuchi, T., Bottcher, A., Quezada, C.M., Meade, T.J., and Gray, H.B., "Inhibition of thermolysin and human α -thrombin by cobalt(III) Schiff base complexes." *Bioorg Med Chem*, **1999**. 7(5): pp. 815-9.
- [560] Takeuchi, T., Böttcher, A., Quezada, C.M., Simon, M.I., Meade, T.J., and Gray, H.B., "Selective inhibition of human α -thrombin by cobalt(III) Schiff Base complexes." *J Am Chem Soc*, **1998**. 120: pp. 8555-8556.
- [561] Schwochau, K., "Technetium radiopharmaceuticals. Fundamentals, synthesis, structure and development." *Angew Chem Int Ed Engl*, **1994**. 33: pp. 2258-2267.
- [562] Sharma, V. and Piwnica-Worms, D., "Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance." *Chem Rev*, **1999**. 99(9): pp. 2545-2560.
- [563] Sessler, J.L. and Miller, R.A., "Texaphyrins: new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy." *Biochem Pharmacol*, **2000**. 59: pp. 733-739.
- [564] Sorenson, J.R.J., *Copper Complexes Offer a Physiological Approach to Treatment of Chronic Disease*, in *Progress in Medicinal Chemistry*, Ellis, G.P. and West, G.B., Editors. **1989**, Elsevier Science Publishers, B.V. pp. 437-568.
- [565] Weder, J.E., Dillon, C.T., Hambley, T.W., Kennedy, B.J., Lay, P.A., Biffin, J.R., Regtop, H.L., and Davies, N.M., "Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized." *Coord Chem Rev*, **2002**. 232: pp. 95-126.
- [566] Jackson, G.E., Mkhonta-Gama, L., Voye, A., and Kelly, M., "Design of copper-based anti-inflammatory drugs." *J Inorg Biochem*, **2000**. 79(1-4): pp. 147-52.

- [567] Kovala-Demertzi, D., "Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity." *J Inorg Biochem*, **2000**. 79(1-4): pp. 153-7.
- [568] Kovala-Demertzi, D., Hadjikakou, S.K., Demertzis, M.A., and Deligiannakis, Y., "Metal ion-drug interactions. Preparation and properties of manganese (II), cobalt (II) and nickel (II) complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity: Behavior in the oxidation of 3,5-di-tert-butyl-o-catechol." *J Inorg Biochem*, **1998**. 69(4): pp. 223-229.
- [569] Konstandinidou, M., Kourounakis, A., Yiangou, M., Hadjipetrou, L., Kovalademertzi, D., Hadjikakou, S., and Demertzis, M., "Anti-inflammatory properties of diclofenac transition metalloelement complexes." *J Inorg Biochem*, **1998**. 70(1): pp. 63-69.
- [570] Hadjikakou, S.K., Demertzis, M.A., Miller, J.R., and Kovala-Demertzi, D., "Synthesis and characterisation of the first organotin complex of piroxicam. An extended network system via non-hydrogen, hydrogen bonding linkages and C-H... π contacts." *J Chem Soc, Dalton Trans*, **1999**: pp. 663-666.
- [571] Cini, R., Giorgi, G., Cinquantini, A., Rossi, C., and Sabat, M., "Metal Complexes of Antiinflammatory Drug Piroxicam." *Inorg Chem*, **1990**. 29(26): pp. 5197-5201.
- [572] Valent, A., Melnik, M., Hudecova, D., Dudova, B., Kivekkas, R., and Sundberg, M.R., "Copper(II) salicylidene-glycinate complexes as potential antimicrobial agents." *Inorg Chim Acta*, **2002**. 340: p. 15-20.
- [573] Saha, D.K., Padhye, S., Anson, C.E., and Powell, A.K., "Hydrothermal synthesis, crystal structure, spectroscopy, electrochemistry and antimicrobial evaluation of the copper(II) ciprofloxacin complex: $[\text{Cu}(\text{cf})_2(\text{BF}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$." *Inorg Chem Comm*, **2002**. 5: pp. 1022-1027.
- [574] Kostova, I.P., Changov, L.S., Keuleyan, E.E., Gergova, R.T., and Manolov, I.I., "Synthesis, analysis and in vitro antibacterial activity of new metal complexes of sulbacom." *Il Farmaco*, **1998**. 53: pp. 737-740.
- [575] Jezowska-Bojczuk, M., Bal, W., and Kasprzak, K.S., "Copper(II) interactions with an experimental antiviral agent, I- deoxynojirimycin, and oxygen activation by resulting complexes." *J Inorg Biochem*, **1996**. 64(4): pp. 231-46.
- [576] Bottari, B., Maccari, R., Monforte, F., Ottana, R., Rotondo, E., and Vigorita, M.G., "Isoniazid-related copper(II) and nickel(II) complexes with antimycobacterial in vitro activity. Part 9." *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**. 10(7): pp. 657-60.
- [577] Dendrinou-Samara, C., Psomas, G., Raptopoulou, C.P., and Kessissoglou, D.P., "Copper(II) complexes with phenoxyalkanoic acids and nitrogen donor heterocyclic ligands: structure and bioactivity." *J Inorg Biochem*, **2001**. 83(1): pp. 7-16.
- [578] de Zwart, M.A.H., van der Groot, H., and Timmerman, H., "Influence of Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), and Cd(II) on growth inhibition and enzyme activity of *mycoplasma gallisepticum* in the absence or presence of a 2, 2' -bipyridyl type ligand." *Eur J Med Chem*, **1991**. 26: pp. 101-108.
- [579] Criado, J.J., Rodriguez-Fernandez, E., Garcia, E., Hermosa, M.R., and Monte, E., "Thiourea derivatives of α -aminoacids. Synthesis and characterization of Ni(II), Cu(II) and Pt(II) complexes with L-valinate derivatives. Antifungal activity." *J Inorg Biochem*, **1998**. 69(1-2): pp. 113-119.
- [580] Briganti, F., Scozzafava, A., and Supuran, C.T., "Sulfonylamido derivatives of aminogluthethimide and their copper(II) complexes: a novel class of antifungal compounds." *Eur J Med Chem*, **1997**. 32: pp. 901-910.

- [581] Gokhale, N.H., Padhye, S.B., Croft, S.L., Kendrick, H.D., Davies, W., Anson, C.E., and Powell, A.K., "Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents. 1. Synthesis, X-ray crystal structures, electrochemistry and antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*." *J Inorg Biochem*, **2003**. 95: pp. 249-258.
- [582] Segla, P., Mikloš, D., Olejníková, P., Kalináková, B., Hudecová, D., Palicová, M., Švorec, J., Valko, M., Melník, M., and Glowiak, T., "Copper(II) pyridinecarboxylate adducts with chelating ligands as potential antimicrobial agents." *Inorg Chim Acta*, **2004**. 357(14): pp. 4172-4180
- [583] Booth, B.A. and Sartorelli, A.C., "Synergetic interactions of kethoxal bis(thio-semicarbazone) and cupric ions in sarcoma 180." *Nature*, **1966**. 210(31): pp. 104-105.
- [584] West, D.X., Liberta, A.E., Padhye, S.B., Chikate, R.C., Sonawane, P.B., Kumbhar, A.S., and Yerande, R.G., "Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies." *Coord Chem Rev*, **1993**. 123(1-2): pp. 49-71.
- [585] Ainscough, E.W., Brodie, A.M., Denny, W.A., Finlay, G.J., and Ranford, R.D., "Nitrogen, sulfur and oxygen donor adducts with copper(II) complexes of antitumor 2-formylpyridinethiosemicarbazone analogs: Physicochemical and cytotoxic studies." *J Inorg Biochem*, **1998**. 70(3-4): pp. 175-185.
- [586] Ferrari, M.B., Fava, G.G., Leporati, E., Pelosi, G., Rossi, R., Tarasconi, P., Albertini, R., Bonati, A., Lunghi, P., and Pinelli, S., "Synthesis, characterisation and biological activity of three copper(II) complexes with a modified nitrogenous base: 5-formyluracil thiosemicarbazone." *J Inorg Biochem*, **1998**. 70(2): pp. 145-154.
- [587] Geromichalos, G.D., Katsoulos, G.A., Hadjikostas, C.C., Kortsaris, A.H., and Kyriakidis, D.A., "In vitro combined effect of a new series of copper (II) complexes with cisplatin or epirubicin on human breast and cervical cancer cell lines." *Drug Exp Clin Res*, **1998**. 24(2): pp. 93-104.
- [588] Geromichalos, G.D., Katsoulos, G.A., Hadjikostas, C.C., Kortsaris, A.H., and Kyriakidis, D.A., "In vitro synergistic effects of some novel Cu(II) complexes in combination with epirubicin and mitomycin C against HeLa-S3 cervical cancer cell line." *Anti-Cancer Drugs*, **1996**. 7: pp. 469-475.
- [589] Blower, P.J., Dilworth, J.R., Maurer, R.I., Mullen, G.D., Reynolds, C.A., and Zheng, Y., "Towards new transition metal-based hypoxic selective agents for therapy and imaging." *J Inorg Biochem*, **2001**. 85(1): pp. 15-22.
- [590] Afrasiabi, Z., Sinn, E., Padhye, S., Dutta, S., Padhye, S., Newton, C., Anson, C.E., and Powell, A.K., "Transition metal complexes of phenanthrenequinone thiosemicarbazone as potential anticancer agents: synthesis, structure, spectroscopy, electrochemistry and in viro anticancer activity against human breast cancer cell-line, T47D." *J Inorg Biochem*, **2003**. 95: pp. 306-314.
- [591] Afrasiabi, Z., Sinn, E., Chen, J., Ma, Y., Rheingold, A.L., Zakharov, L.N., Rath, N., and Padhye, S., "Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes." *Inorg Chim Acta*, **2004**. 357(1): pp. 271-278.
- [592] Gokhale, N., Padhye, S., Rathbone, D., Billington, D., Lowe, P., Schwalbe, C., and Newton, C., "The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone - a potential antitumor agent." *Inorg Chem Comm*, **2001**. 4: pp. 26-29.
- [593] Gokhale, N.H., Padhye, S.S., Padhye, S.B., Anson, C.E., and Powell, A.K., "Copper complexes of carboxamidrazone derivatives as anticancer agents. 3.Synthesis, characterization and

crystal structure of [Cu(appc)Cl₂], (appc = N1-(2-acetylpyridine)pyridine-2-carboxamidrazone)." *Inorg Chim Acta*, **2001**. 319: pp. 90-94.

[594] Marin-Hernandez, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramirez, L., and Moreno-Sanchez, R., "Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions." *Biochem Pharmacol*, **2003**. 65: pp. 1979-1989.

[595] De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J.A., and Dobrota, M., "Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II." *Toxicology*, **2003**. 194: pp. 103-113.

[596] De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G.E., Kelland, L.R., Orr, R.M., and Dobrota, M., "Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells." *Toxicol in Vitro*, **2000**. 14(1): pp. 1-5.

[597] Arnaudeau, C., Tenorio Miranda, E., Jenssen, D., and Helleday, T., "Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells." *Mut Res*, **2000**. 461: pp. 221-228.

[598] Routier, S., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Colson, P., Houssier, C., Rivalle, C., Bisagni, E., and Bailly, C., "Synthesis, DNA binding, and cleaving properties of an ellipticine-salen.copper conjugate." *Bioconjug Chem*, **1997**. 8(6): pp. 789-92.

[599] Routier, S., Bernier, J.-L., Catteau, J.-P., and Bailly, C., "Recognition and cleavage of DNA by a distamycin-salen copper conjugate." *Bioorg Med Chem Lett*, **1997**. 7(13): pp. 1729-1732.

[600] Levy, M.J. and Hecht, S.M., "Copper(II) facilitates bleomycin-mediated unwinding of plasmid DNA." *Biochemistry*, **1988**. 27(8): pp. 2647-50.

[601] Petering, D.H., Xiao, J., Nyayapati, S., Fulmer, P., and Antholine, W.E., *Oxidation damage by bleomycin, adriamycin and other cytotoxic agents that requires iron or copper*, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, Farrell, N.P., Editor. **1999**, Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp. 135-157.

[602] Chen, J. and Stubbe, J.-A., "Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues." *Curr Opin Chem Biol*, **2004**. 8(2): pp. 175-181.

[603] Blower, P.J., Lewis, J.S., and Zweit, J., "Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine." *Nucl Med Biol*, **1996**. 23: pp. 957-980.

[604] Cutler, C.S., Wuest, M., Anderson, C.J., Reichert, D.E., Sun, Y., Martell, A.E., and Welch, M.J., "Labeling and in vivo evaluation of novel copper(II) dioxotetraazamacrocyclic complexes." *Nucl Med Biol*, **2000**. 27(4): pp. 375-80.

[605] Lewis, J.S., Dearling, J.L., Sosabowski, J.K., Zweit, J., Carnochan, P., Kelland, L.R., Coley, H.M., and Blower, P.J., "Copper bis(diphosphine) complexes: radiopharmaceuticals for the detection of multi-drug resistance in tumours by PET [In Process Citation]." *Eur J Nucl Med*, **2000**. 27(6): pp. 638-46.

[606] Moran, J.K., Greiner, D.P., and Meares, C.F., "Improved synthesis of 6-(p-(bromoacetamido)benzyl)-1,4,8,11-tetraacetic acid and development of a thin-layer assay for thiol-reactive bifunctional chelating agents." *Bioconjugate Chem*, **1995**. 6: pp. 296-301.

- [607] DeCamp, D.L., Babe, L.M., Salto, R., Lucich, J.L., Koo, M.-S., Kahl, S.B., and Craik, C.S., "Specific Inhibition of HIV-1 Protease by Boronated Porphyrins." *J Med Chem*, **1992**. 35: pp. 3426-3428.
- [608] Davis, D.A., Branca, A.A., Pallenberg, A.J., Marschner, T.M., Patt, L.M., Chatlynne, L.G., Humphrey, R.W., Yarchoan, R., and Levine, R.L., "Inhibition of the human immunodeficiency virus-1 protease and human immunodeficiency virus-1 replication by bathocuproine disulfonic acid Cu^{+1} ." *Arch Biochem Biophys*, **1995**. 322(1): pp. 127-134.
- [609] Giacobazzo, C., Monaco, H.L., Artioli, G., Viterbo, D., Ferraris, G., Gilli, G., Zanotti, G., and Catti, M., *Fundamentals of crystallography*, ed. Giacobazzo, C. **2002**, New York, USA: Oxford University Press. 825.
- [610] Wouters, J. and Ooms, F., "Small molecule crystallography in drug design." *Curr Pharm Des*, **2001**. 7: pp. 529-545.
- [611] Enraf-Nonius, ed. *ENRAF-NONIUS CAD-4 EXPRESS Software 5.0*. **1992**: Delft, The Netherlands.
- [612] Nonius, B.V. and Instruments, D., eds. *NONIUS CAD-4 MACH3 : A collect software*. **2000**: Delft, the Netherlands.
- [613] Sheldrick, G.M., *SHELXL-97 : program for the refinement of crystal structures*, **1997**, University of Göttingen: Göttingen, Germany
- [614] Spek, A.L., *PLATON : A multipurpose crystallographic tool*, **2001**, University of Utrecht: Utrecht, The Netherlands
- [615] Allen, F.H., "The Cambridge Structural Database : a quarter of a million crystal structures and rising." *Acta Cryst B*, **2002**. 58(3): pp. 380-388.
- [616] Siuzdak, G., *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic press, **1996**, San Diego, California: Department of Chemistry, The Scripps Research Institute.
- [617] Kebarle, P. and Tang, L., "From ions in solution to ions in gas phase." *Anal Chem*, **1993**. 65(22): pp. 972A-986A.
- [618] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Withers, C.M., "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science*, **1989**. 24: pp. 64-70.
- [619] Hofstadler, S.A., Bakhtiar, R., and Smith, R.D., "Electrospray ionisation mass spectrometry. Part I: Instrumentation and spectral interpretation." *J Chem Educ*, **1996**. 73(4): pp. A82-A88.
- [620] Bruins, A.P., "Mechanistic aspects of electrospray ionisation." *J Chrom A*, **1998**. 794: pp. 345-357.
- [621] Stewart, I.I., "Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation." *Spectrochim Acta, Part B*, **1999**. 54: pp. 1649-1695.
- [622] Hop, C.E.A. and Bakhtiar, R., "Electrospray ionization mass spectrometry: Part III: Applications in inorganic chemistry and synthetic polymer chemistry." *J Chem Educ*, **1996**. 73(8): pp. A162-A169.
- [623] Knowles, P.F.M., D.; Rattle, H. W. E, *Magnetic Resonance of Biomolecules*. **1976**, Chichester, Engl.: Wiley. 356 pages.

- [624] Leach, A.R., *Quantum mechanical models*, in *Molecular modeling : principles and applications*, Longman, A.W., Editor. **1996**: Harlow, England. pp. 25-130.
- [625] Frisch, M.J., Trucks, G.W., and Schlegel, H.B., *Gaussian 98*, **2001**, revision A.11, Gaussian Inc: Pittsburgh PA, USA
- [626] Leach, A.R., *Empirical force field models : molecular mechanics*, in *Molecular modeling: principles and applications*, Longman, A.W., Editor. **1996**: Harlow, England.
- [627] Lipkowitz, K.B., "Abuses of molecular mechanics: Pitfalls to Avoid." *J Chem Educ*, **1995**. 72(12): pp. 1070-1075.
- [628] Shi, S., Yan, L., Yang, Y., Fischer-Shaulsky, J., and Thacher, T., "An extensible and systematic force field, ESFF, for molecular modeling of organic, inorganic, and organometallic systems." *J Comput Chem*, **2003**. 24: pp. 1059-1076.
- [629] Biosym/MSI, ed. *Discover, user guide*. Vol. 1. **1995**: San Diego.
- [630] Accelrys, *Insight II*, **2000**, San Diego CA, USA
- [631] Leach, A.R., *Energy minimisation and related methods for exploring the energy surface*, in *Molecular modelling : principles and applications*, Longman, A.D., Editor. **1996**: Harlow, England. pp. 211-260.
- [632] Ryvkin, F. and Greenaway, F.T. *Computer-simulated model of the copper-binding site of lysyl oxidase using extended systematic force field calculations*. in *223rd ACS national meeting*. 2002. Orlando, FL, USA: American Chemical Society.
- [633] Nowak, W., Wojtczak, A., and Cody, V., "Computer modeling with the ESFF forcefield of human dihydrofolate reductase ternary complex with NADPH and piritrexim (PTX) inhibitor." *Internet J Chem*, **1999**. 2: Article N° 12.
- [634] Comba, P. and Remenyi, R., "Inorganic and bioinorganic molecular mechanics modeling - the problem of the force field parametrization." *Coord Chem Rev*, **2003**. 238-239: pp. 9-20.
- [635] Norrby, P.-O. and Comba, P., "Deriving force field parameters for coordination complexes." *Coord Chem Rev*, **2001**. 212: pp. 79-109.
- [636] Comba, P., "Strains and stresses in coordination compounds." *Coord Chem Rev*, **1999**. 182: pp. 343-371.
- [637] Comba, P., "Metal ion selectivity and molecular modeling." *Coord Chem Rev*, **1999**. 185-186: pp. 81-98.
- [638] Bol, J.E., Buning, C., Comba, P., Reedijk, J., and Ströhle, M., "Molecular Mechanics Modeling of Organic Backbone of Metal-Free and Coordinated Ligands." *J Comput Chem*, **1998**. 19(5): pp. 512-523.
- [639] Gajewski, J.J., Gilbert, K.E., and Kreek, T.W., "General molecular mechanics approach to transition metal complexes." *J Comput Chem*, **1998**. 19(10): pp. 1167-1178.
- [640] Halgren, T.A. and Damm, W., "Polarizable force fields." *Curr Opin Struct Biol*, **2001**. 11(2): pp. 236-42.
- [641] Gresh, N., Kafafi, S.A., Truchon, J.-F., and Salahub, D.R., "Intramolecular interaction energies in model alanine and glycine tetrapeptides. Evaluation of anisotropy, polarization, and

correlation effects. A parallel ab initio HF/MP2, DFT, and polarizable molecular mechanics study." *J Comput Chem*, **2004**. 25(6): pp. 823-834.

[642] Gresh, N. and Shi, G.-B., "Conformation-dependant intermolecular interaction energies of the triphosphate anion with divalent metal cations. Application to the ATP-binding site of a binuclear bacterial enzyme. A parallel quantum chemical and polarizable molecular mechanics investigation." *J Comput Chem*, **2004**. 25: pp. 160-168.

[643] Gresh, N. and Derreumaux, P., "Generating conformations for the two zinc-binding sites of HIV-1 nucleocapsid protein from random conformations by a hierarchical procedure and polarizable force field." *J Phys Chem B*, **2003**. 107: pp. 4862-4870.

[644] Antony, J., Gresh, N., Olsen, L., Hemmingsen, L., Schofield, C.J., and Bauer, R., "Binding of D- and L-captopril inhibitors to metallo-lactamase studied by polarizable molecular mechanics and quantum mechanics." *J Comput Chem*, **2002**. 23(13): pp. 1281-1296.

[645] Garmer, D.R., Gresh, N., and Roques, B.P., "Modeling of inhibitor-metalloenzyme interactions and selectivity using molecular mechanics grounded in quantum chemistry." *Proteins*, **1998**. 31(1): pp. 42-60.

[646] Gresh, N. and Roques, B.-P., "Thermolysin-inhibitor binding: effect of the His231->Ala mutation on the relative affinities of thiolate versus phosphoramidate inhibitors. A model theoretical investigation incorporating a continuum reaction field hydration model." *Biopolymers*, **1997**. 41: pp. 145-164.

[647] Gresh, N., Sponer, J.E., Spackova, N., Leszczynski, J., and Sponer, J., "Theoretical study of the binding of hydrated Zn(II) and Mg(II) cations to 5'-guanosine monophosphate. Toward polarizable molecular mechanics for DNA and RNA." *J Phys Chem B*, **2003**: pp. 8669-8681.

[648] Tiraboschi, G., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B.-P., and Gresh, N., "Intermolecular chelation of Zn^{2+} by α and β -mercaptocarboxamides. A parallel ab initio and polarizable molecular mechanics investigation. Assessment of the role of multipole transferability." *J Comput Chem*, **2001**. 22(10): pp. 1038-1047.

[649] Rogalewicz, F., Ohanessian, G., and Gresh, N., "Interaction of neutral and zwitterionic glycine with Zn^{2+} in gas phase: ab initio and SIBFA molecular mechanics calculations." *J Comput Chem*, **2000**. 21(11): pp. 963-973.

[650] Tiraboschi, G., Gresh, N., Giessner-Prettre, C., Pedersen, L.G., and Deerfield, D.W., "Parallel ab initio and molecular mechanics investigation of polycoordinated Zn(II) complexes with model hard and soft ligands: variations of binding energy and of its components with number and charges of ligands." *J Comput Chem*, **2000**. 21(12): pp. 1011-1039.

[651] Gresh, N. and Sponer, J., "Complexes of pentahydrated Zn^{2+} with Guanine, Adenine, and the Guanine-Cytosine and Adenine-Thymine base pairs. Structures and energies characterized by polarizable molecular mechanics and ab initio calculations." *J Phys Chem B*, **1999**. 103: pp. 11415-11427.

[652] Tiraboschi, G., Roques, B.-P., and Gresh, N., "Joint quantum chemical and polarizable molecular mechanics investigation of formate complexes with penta- and hexahydrated Zn^{2+} : comparison between energetics of model bidentate, monodentate, and trough-water Zn^{2+} binding modes and evaluation of nonadditivity effects." *J Comput Chem*, **1999**. 20(13): pp. 1379-1390.

- [653] Gresh, N., "Energetics of Zn^{2+} binding to a series of biologically relevant ligands: a molecular mechanics investigation grounded on ab initio self-consistent field supermolecular computation." *J Comput Chem*, **1995**. 16(7): pp. 856-882.
- [654] Gresh, N., Policar, C., and Giessner-Prettre, C., "Modeling copper(I) complexes : SIBFA molecular mechanics versus ab initio energetics and geometric arrangements." *J Phys Chem A*, **2002**. 106(23): pp. 5660-5670.
- [655] Gresh, N. and Garmer, D.R., "Comparative binding energetics of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to biologically relevant ligands: combined ab initio SCF supermolecule and molecular mechanics investigation." *J Comput Chem*, **1996**. 17(12): pp. 1481-1495.
- [656] Garmer, D.R. and Gresh, N., "A comprehensive energy component analysis of the interaction of hard and soft dication with biological ligands." *J Am Chem Soc*, **1994**. 116(8): pp. 3556-3567.
- [657] Piquemal, J.-P., Williams-Hubbard, B., Fey, N., Deeth, R.J., Gresh, N., and Giessner-Prettre, C., "Inclusion of the ligand field contribution in a polarizable molecular mechanics: SIBFA-LF." *J Comput Chem*, **2003**. 24: pp. 1963-1970.
- [658] Gresh, N., Claverie, P., and Pullman, A., "Intermolecular interactions: elaboration on an additive procedure including an explicit charge-transfer contribution." *Int J Quant Chem*, **1986**. XXIX: pp. 101-118.
- [659] Vigné-Maeder, F. and Claverie, P., "The exact multicenter multipolar part of a molecular charge distribution and its simplified representations." *J Chem Phys*, **1988**. 88(8): pp. 4934-4948.
- [660] Gresh, N., "Model, multiply hydrogen-bonded oligomers (N=3-20). How closely can a separable, ab initio grounded molecular mechanics procedure reproduce the results of supermolecule quantum chemical computations?" *J Phys Chem A*, **1997**. 101: pp. 8680-8694.
- [661] Garmer, D.R. and Stevens, W.J., "Transferability of molecular distributed polarizabilities from a simple localized orbital based method." *J Phys Chem*, **1989**. 93: pp. 8263-8270.
- [662] Gresh, N., Guo, H., Salahub, D.R., Roques, B.P., and Kafafi, S.A., "Critical role of anisotropy for the dimerization energies of two protein-protein recognition motifs: cis-N-methylacetamide versus a beta-sheet conformer of alanine dipeptide; A joint ab initio, density functional theory and molecular mechanics investigation." *J Am Chem Soc*, **1999**. 121: pp. 7885-7894.
- [663] Gresh, N., Claverie, P., and Pullman, A., "Theoretical studies of molecular conformation. Derivation of an additive procedure for the computation of intramolecular interaction energies. Comparison with ab initio SCF computations." *Theoret Chim Acta*, **1984**. 66: pp. 1-20.
- [664] Ledecq, M., Lebon, F., Durant, F., Giessner-Prettre, C., Marquez, A., and Gresh, N., "Modeling of copper(II) complexes with the SIBFA Polarizable molecular mechanics procedure. Application to a new class of HIV-1 protease inhibitor." *J Phys Chem B*, **2003**. 107: pp. 10640-10652.
- [665] Papageorgiou, D.G., Lagaris, I.E., Papanicolaou, N.I., Petsos, G., and Polatoglou, H.M., "MERLIN a versatile optimization environment applied to the design of metallic alloys and intermetallic compounds." *Comput Mat Sc*, **2003**. 28: pp. 125-133.
- [666] Papageorgiou, D.G., Demetropoulos, G.N., and Lagaris, I., "MERLIN-3.0 A multidimensional optimization environment." *Comput Phys Comm*, **1998**. 109: pp. 227-249.
- [667] Evangelakis, G., Rizos, J., Lagaris, I., and Demetropoulos, G.N., "Merlin - a portable system for multidimensional minimization." *Comput Phys Commun*, **1987**. 46: pp. 401.

- [668] Langlet, J., Claverie, P., Caillet, J., and Pullman, A., "Improvements of the continuum model. 1. Application to the calculation of the vaporization thermodynamic quantities of nonassociated liquids." *J Phys Chem*, **1988**. 92: pp. 1617-1631.
- [669] Lebon, F., *Conception de novo d'inhibiteurs non peptidiques de la protéase du virus d'immunodéficience humaine de type I*, in *Facultés des sciences*. **1998**, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix: Namur. 245 pages.
- [670] Desiraju, G.R. and Steiner, T., *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*. IUCr Monographs on crystallography, ed. crystallography, I.u.o. **1999**, Oxford, UK: Oxford university Press. 507 pages.
- [671] Hunter, C.A., "Arene-arene interaction: electrostatic or charge transfer." *Angew Chem Int Ed Engl*, **1993**. 32(11): pp. 1584-1586.
- [672] Hunter, C.A. and Sanders, J.K.M., "The nature of π - π interactions." *J Am Chem Soc*, **1990**. 112: pp. 5525-5534.
- [673] Williams, J.H., "The molecular electric quadrupole moment and solid-state architecture." *Acc Chem Res*, **1993**. 26(11): pp. 593-598.
- [674] Luhmer, M., Bartik, K., Dejaegere, A., Bovy, P., and Reisse, J., "The importance of quadrupolar interactions in molecular recognition processes involving a phenyl group." *Bull Soc Chim Fr*, **1994**. 131: pp. 603-606.
- [675] Castellano, R.K., Diederich, F., and Meyer, E.A., "Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition." *Angew Chem Int Ed*, **2003**. 42: pp. 1210-1250.
- [676] Waters, M.L., "Aromatic interactions in model systems." *Curr Opin Chem Biol*, **2002**. 6: pp. 736-741.
- [677] McGaughey, G.B., Gagne, M., and Rappe, A.K., "pi-stacking interactions - Alive and well in proteins." *J Biol Chem*, **1998**. 273(25): pp. 15458-15463.
- [678] Lebon, F., Ledecq, M., Dieu, M., Demazy, C., Remacle, J., Lapouyade, R., Kahn, O., and Durant, F., "Synthesis and structural analysis of the copper(II) complexes of N2-(2- pyridylmethyl)-2- pyridinecarboxamide." *J Inorg Biochem*, **2001**. 86(2-3): pp. 547-54.
- [679] Addison, A.W., Rao, T.N., Reedijk, J., van Rijn, J., and Verschoor, G.C., "Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(ii) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua (1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane)copper(ii) perchlorate." *J Chem Soc Dalton Trans*, **1984**: pp. 1349-1356.
- [680] Sigel, H. and Martin, R.B., "Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands." *Chem Rev*, **1982**. 82: pp. 385-426.
- [681] Rowland, J.M., Olmstead, M.M., and Mascharak, P.K., "Unusual Reactivity of Methylene Group Adjacent to Pyridine-2-Carboxamido Moiety in Iron(III) and Cobalt(III) Complexes." *Inorg Chem*, **2002**. 41(10): pp. 2754-2760.
- [682] Wu, J. and Wesdemiotis, C., "Cu(NH₃)₁₋₂ complexes: formation and characterization in the gas phase by neutralization-reionization mass spectrometry." *Chem Phys Lett*, **1999**. 303: pp. 243-247.
- [683] Sieron, L. and Bukowska-Strzyzewska, M., "*trans*-Diaquabis(pyridine-2-carboxamide-*N'*,*O*)copper(II) Dichloride and Dibromide." *Acta Cryst*, **1997**. C53: pp. 296-298.

- [684] Sieron, L. and Bukowska-Strzyzewska, M., "trans-Diperchloratobis(pyridine-2-carboxamide-N1,O)copper(II)." *Acta Cryst C*, **1998**. 54: pp. 322-324.
- [685] Lebon, F., Ledecq, M., Benatallah, Z., Sicsic, S., Lapouyade, R., Kahn, O., Garçon, A., Reboud-Ravaux, M., and Durant, F., "Synthesis and structural analysis of copper(II) pyridineamide complexes as HIV-1 protease inhibitors." *J Chem Soc Perkin Trans 2*, **1999**. 4: pp. 795-800.
- [686] Di Leo, D., Berrettini, F., and Cini, R., "Synthesis of platinum(II)-piroxam compounds. Crystal structure of trans-dichloro(n2-ethene)(piroxam)platinum(II)." *J Chem Soc Dalton Trans*, **1998**: pp. 1993-2000.
- [687] Bertrand, J.A., Fujita, E., and Eller, P.G., "Crystal and molecular structure of bis[N(picolinoyl)-3-amino-1-propoxidoaquocopper(II)] dihydrate. Copper(II) dimer containing a bent four-membered ring." *Inorg Chem*, **1974**. 13(9): pp. 2067-71.
- [688] Huheey, J.E., Keiter, E.A., and Keiter, R.L., *Chimie Inorganique*, ed. s.a., D.L. **1996**, Paris, Bruxelles.
- [689] Orgel, L.E., *An introduction to transition-metal chemistry : ligand field theory*, ed. Methuen. **1971**, London: Butler and Tanner Ltd. 186.
- [690] Wijnands, P.E.M., *The Jahn-Teller effect in crystals of hexacoordinated copper(II) complexes*. **1989**, Rijksuniversiteit Leiden.
- [691] Hataway, B.J. and Billing, D.E., "The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion." *Coord Chem Rev*, **1970**. 5: pp. 143-207.
- [692] Jahn, H.A. and Teller, E., "Stability of polyatomic molecules in degenerate electronic states I-Orbital Degeneracy." *Proceedings of the Royal Society of London*, **1937**. 161: pp. 220-235.
- [693] Jahn, H.A., "Stability of polyatomic molecules in degenerate electronic states II-spin degeneracy." *Proceedings of the Royal Society of London*, **1938**. 164: pp. 117-131.
- [694] Venkataraman, D., Du, Y., Wilson, S.R., Hirsch, K.A., Zhang, P., and Moore, J.S., "A coordination geometry table of the d-block elements and their ions." *J Chem Educ*, **1997**. 74(8): pp. 915-918.
- [695] Erickson, J., Neidhart, D.J., VanDrie, J., Kempf, D.J., Wang, X.C., Norbeck, D.W., Plattner, J.J., Rittenhouse, J.W., Turon, M., Wideburg, N., Kohlbrenner, W.E., Simmer, R., Helfrich, R., Paul, D.A., and Knigge, M., "Design, activity, and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease." *Science*, **1990**. 249: pp. 527-533.
- [696] Thaisrivongs, S., Tomasselli, A.G., Moon, J.B., Hui, J.O., McQuade, T.J., Turner, S.R., Strohbach, J.W., Howe, W.J., Tarpley, W.G., and Heinrickson, R.L., "Inhibitors of the protease from human immunodeficiency virus: design and modeling of a compound containing a dihydroxyethylene isostere insert with high binding affinity and effective antiviral activity." *J Med Chem*, **1991**. 34: pp. 2344-2356.
- [697] Bone, R., Vacca, J.P., Anderson, P.S., and Holloway, M.K., "X-ray crystal structure of the HIV protease complex with L-700,417, an inhibitor with pseudo C2 symmetry." *J Am Chem Soc*, **1991**. 113: pp. 9382-9384.
- [698] Kettle, S.F.A., *Stabilité des composés de coordination*, in *Physico-chimie inorganique. Une approche basée sur la chimie de coordination.*, De Boeck, Editor. **1999**: Bruxelles.

- [699] Scheller-Krattiger, V.S., Kurt H.; Sinn, Ekk; Martin, R. Bruce., "Comparison of complexes with anionic and neutral amide groups. Crystal and molecular structures of bis N-(2-pyridyl)acetamide complexes of palladium(II), nickel(II), and zinc(II)." *Inorg Chim Acta*, **1982**. 60: pp. 54-52.
- [700] Jitsukawa, K., Shiozaki, H., and Masuda, H., "Epoxidation activities of mononuclear ruthenium-oxo complexes with a square planar 6,6'-bis(benzoylamino)-2,2'-bipyridine and axial ligands." *Tetrahedron Letters*, **2002**. 43(8): pp. 1491-1494.
- [701] Harata, M., Jitsukawa, K., Masuda, H., and Einaga, H., "Preparations, structures, and properties of Cu(II) complexes with tripodal tetradentate ligand, tris(6-pivaloylamino-2-pyridylmethyl)amine (Htpa), and reaction of its Cu(I) complex with dioxygen." *Bull Chem Soc Jpn*, **1998**. 71(3): pp. 637-645.
- [702] Schneider, J.P. and Kelly, J.W., "Synthesis and Efficacy of Square Planar Copper Complexes Designed to Nucleate β -Sheet Structure." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117(9): pp. 2533-46.
- [703] Lebon, F., Boggetto, N., Ledecq, M., Durant, F., Benatallah, Z., Sicsic, S., Lapouyade, R., Kahn, O., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., and Reboud-Ravaux, M., "Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery. N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease." *Biochem Pharmacol*, **2002**. 63(10): pp. 1863-73.
- [704] Nagane, R., Koshigoe, T., Chikira, M., and Long, E.C., "The DNA-bound orientation of Cu(II)-Xaa-Gly-His metalloptides." *J Inorg Biochem*, **2001**. 83(1): pp. 17-23.
- [705] Ringbom, A., *Les complexes en chimie analytique*, ed. Dunod. **1967**, Paris.
- [706] Kettle, S.F.A., *Physico-chimie inorganique: une approche basée sur la chimie de coordination*, ed. De Boeck, **1999**, Bruxelles.
- [707] Hancock, R.D. and Martell, A.E., "Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution." *Chem Rev*, **1989**. 89: pp. 1875-1914.
- [708] Pearson, R.G., "Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases." *J Chem Educ*, **1987**. 64(7): pp. 561-7.
- [709] Chung, C.-S., "Entropy effects in chelation reactions." *J Chem Educ*, **1984**. 61(12): pp. 1062-1064.
- [710] Myers, R.T., "Thermodynamics of chelation." *Inorg Chem*, **1978**. 17(4): pp. 952-958.
- [711] Sigel, H., Saha, A., Saha, N., Carloni, P., Kapinos, L.E., and Griesser, R., "Evaluation of intramolecular equilibria in complexes formed between substituted imidazole ligands and nickel (II), copper (II) or zinc (II)." *J Inorg Biochem*, **2000**. 78(2): pp. 129-37.
- [712] Comba, P. and Schiek, W., "Fit and misfit between ligands and metal ions." *Coord Chem Rev*, **2003**. 238-239: pp. 21-29.
- [713] Connors, K.A., *Binding constants : the measurement of molecular complex stability*, ed. Wiley. **1987**, New York.
- [714] Bagus, P.S. and Illas, F., "Decomposition of the chemisorption bond by constrained variations : order of the variations and construction of the variational spaces." *J Chem Phys*, **1992**. 96(12): pp. 8962-8970.

- [715] Leach, A.R., *Three challenges in molecular modelling: free energies, solvation and simulating reactions*, in *Molecular modelling, principles and applications*, Longman, A.D., Editor. **1996**: Harlow. pp. 481-541.
- [716] Comba, P. and Sickmüller, A.F., "Modeling the redox properties of (hexaamine)cobalt(II/II) couples." *Inorg Chem*, **1997**. 36(20): p. 4500-4507.
- [717] Bernhardt, P.V. and Comba, P., "Molecular mechanics calculations of transition metal complexes." *Inorg Chem*, **1992**. 31(12): pp. 2638-2644.
- [718] Sabolovic, J., Tautermann, C.S., Loerting, T., and Liedl, K., "Modeling Anhydrous and Aqua Copper(II) Amino Acid Complexes: A New Molecular Mechanics Force Field Parametrization Based on Quantum Chemical Studies and Experimental Crystal Data." *Inorg Chem*, **2003**. 42,(7): pp. 2268-2279.
- [719] Kaitner, B., Paulic, N., Pavlovic, G., and Sabolovic, J., "Bis(L-N,N-dipropylalaninato)copper(II) X-ray crystal structure, the crystal structure prediction and conformational analysis with a new force field." *Polyhedron*, **1999**. 18(17): pp. 2301-2311.
- [720] Deeth, R.J. and Paget, V., "Molecular mechanics calculations on imine and mixed-ligand systems of CoIII, NiII and CuII." *J Chem Soc Dalton Trans*, **1997**: pp. 537-546.
- [721] Deeth, R.J., "The ligand field molecular mechanics model and the stereoelectronic effects of d and s electrons." *Coord Chem Rev*, **2001**. 212: p. 11-34.
- [722] Burton, V.J., Deeth, R.J., Kemp, C.M., and Gilbert, P.J., "Molecular mechanics for coordination complexes: the impact of adding d-electron stabilization energies." *J Am Chem Soc*, **1995**. 117: pp. 8407-8415.
- [723] Gerloch, M., Harding, J.H., and Woolley, R.G., "The context and application of ligand field theory." *Struct Bonding*, **1981**. 46: pp. 1-45.
- [724] Woodley, S.M., Battle, P.D., Catlow, C.R.A., and Gale, J.D., "Development of a new interatomic potential for the modeling of ligand field effects." *J Phys Chem B*, **2001**. 105: pp. 6824-6830.
- [725] Harcourt, R.D., Skrezenek, F.L., and MacLagan, R.G.A.R., "Nonempirical valence bond studies of the origin of the antiferromagnetism of copper(II) carboxylate dimers." *J Am Chem Soc*, **1986**. 108: pp. 5403-5408.
- [726] Sharrock, P. and Melnik, M., "Copper(II) acetates: from dimer to monomer." *Can J Chem*, **1985**. 63(1): pp. 52-56.
- [727] Zielkiewicz, J., Uruska, I., and Szpakowska, M., "The role of water and pyridine derivatives in dissociation of binuclear Cu(II) carboxylate complexes." *Pol J Chem*, **1991**. 65: pp. 177-184.
- [728] Szpakowska, M. and Uruska, I., "Monomer-dimer equilibria in solutions of copper(II) carboxylates. Part I. Cu(CH₃COO)₂-3-chloropyridine-chlorobenzène system." *Pol J Chem*, **1980**. 54: pp. 1661-1670.
- [729] Stephens, J.C., Khan, M.A., and Houser, R.P., "Copper(II) acetate complexes, (CuL_m(OAc)₂)_n (L=HNPPH₃), stable in solid state either as a dimer (m=1, n=2) or a monomer (m=2, n=1)." *Inorg Chem*, **2001**. 40: pp. 5064-5065.
- [730] Tackett, J.E., "FT-IR characterization of metal acetates in aqueous solution." *Appl Spectrosc*, **1989**. 43(3): pp. 483-9.

- [731] Vetere, V.F. and Romagnoli, R., "Study of the complexation equilibria using polarized metallic electrodes." *Analyst*, **1991**. 116(9): pp. 937-940.
- [732] Pettit, L.D. and Powell, K.J., *Stability Constants Database (SC-Database)*, **1999**, 4, IUPAC and Academic Software: Yorks (UK)
- [733] Ghermani, N.-E., Bouhmaida, N., Lecomte, C., Papet, A.-L., and Marsura, A., "Use of experimental electrostatic potential to predict the complexation of metallic atoms: the case of bipyridine ligands." *J Phys Chem*, **1994**. 98: pp. 6287-6292.
- [734] Martell, A.E. and Smith, R.M., *Critical stability constants*. **1982**, New York: Plenum Press.
- [735] Routier, S., Vezin, H., Lamour, E., Bernier, J.L., Catteau, J.P., and Bailly, C., "DNA cleavage by hydroxy-salicylidene-ethylenediamine-iron complexes." *Nucleic Acids Res*, **1999**. 27(21): pp. 4160-6.
- [736] Weiss, R., "AIDS, unbeatable 20 years on." *Lancet*, **2001**. 357(9274): pp. 2073-4.

ANNEXES A : Données cristallographiques**1. COL-XOSNOI****1.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination**

<u>Crystal Data</u>			
Empirical Formula	C ₂₆ H ₂₈ Cu N ₆ O ₃ , 2(ClO ₄)		
Formula Weight	734.99		
Crystal System	Triclinic		
Space group	P-1 (No. 2)		
a, b, c [Angstrom]	10.1250(10)	12.820(2)	13.019(2)
alpha, beta, gamma [deg]	98.014(12)	104.029(9)	104.789(9)
V [Ang ³]	1548.3(4)		
Z	2		
D(calc) [g/cm ³]	1.577		
F(000)	754		
μ(CuKα) [/mm]	3.2		
Crystal Size [mm]	0.05 x 0.10 x 0.20		

<u>Data Collection</u>			
Temperature (K)	293		
Radiation [Angstrom]	CuKα 1.54178		
Theta Min-Max [Deg]	3.6, 54.2		
Dataset	-10: 10 ; 0: 13 ; -13: 13		
Tot., Uniq. Data, R(int)	3783,	3783,	0.000
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	2031		

<u>Refinement</u>			
Refinement method	on F ²		
Nref, Npar	3783, 228		
R, wR, S	0.0976, 0.2652, 1.17		
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00		
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.79, 0.77		

1.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	----	----	----	-----
Cu1	0.02832(15)	0.26090(12)	0.73905(12)	0.0474(6)
O9	-0.3948(8)	0.1296(5)	0.6028(6)	0.0541(19)
O25	0.0994(8)	0.1090(5)	0.6531(6)	0.0550(19)
O34	0.0255(9)	0.4331(6)	0.8418(6)	0.069(2)
N2	-0.0839(9)	0.1684(6)	0.8212(6)	0.049(2)
N10	-0.1588(9)	0.2260(6)	0.6393(7)	0.046(2)
N17	0.0864(9)	0.3399(6)	0.6261(6)	0.045(2)
N18	0.2230(9)	0.2745(6)	0.8367(6)	0.046(2)
N26	0.3212(10)	0.1200(6)	0.6424(7)	0.049(2)
N33	0.4118(10)	0.1716(7)	0.4454(7)	0.054(2)
C3	-0.0443(13)	0.1391(9)	0.9153(9)	0.064(3)
C4	-0.1353(13)	0.0737(9)	0.9588(10)	0.072(4)
C5	-0.2803(13)	0.0304(9)	0.8989(9)	0.068(3)
C6	-0.3242(12)	0.0569(8)	0.8005(8)	0.052(3)
C7	-0.2297(11)	0.1244(8)	0.7620(8)	0.046(3)
C8	-0.2648(11)	0.1633(8)	0.6613(8)	0.043(3)
C11	-0.1714(11)	0.2719(8)	0.5454(8)	0.050(3)

C12	-0.0273(11)	0.3285(8)	0.5355(8)	0.046(3)
C13	-0.0023(12)	0.3686(9)	0.4491(9)	0.061(3)
C14	0.1321(12)	0.4204(9)	0.4458(9)	0.061(3)
C15	0.2464(14)	0.4320(9)	0.5360(9)	0.069(3)
C16	0.2151(12)	0.3920(8)	0.6208(9)	0.056(3)
C19	0.2762(12)	0.3417(9)	0.9376(9)	0.057(3)
C20	0.3957(13)	0.3314(10)	1.0111(10)	0.068(3)
C21	0.4645(14)	0.2620(9)	0.9823(9)	0.066(3)
C22	0.4110(13)	0.1946(9)	0.8783(9)	0.061(3)
C23	0.2951(11)	0.2072(8)	0.8084(8)	0.045(3)
C24	0.2336(12)	0.1410(8)	0.6939(8)	0.044(3)
C27	0.2719(12)	0.0489(8)	0.5323(8)	0.053(3)
C28	0.2808(11)	0.1147(8)	0.4502(8)	0.045(3)
C29	0.1646(13)	0.1266(9)	0.3745(9)	0.060(3)
C30	0.1832(14)	0.1893(10)	0.3016(10)	0.073(4)
C31	0.3227(13)	0.2459(9)	0.3011(10)	0.066(3)
C32	0.4363(14)	0.2364(9)	0.3774(10)	0.070(3)
C35	0.1039(16)	0.5418(11)	0.8416(11)	0.085(4)
C36	0.1196(18)	0.6245(12)	0.9390(13)	0.114(6)
C137	0.3688(3)	0.5677(3)	0.2582(3)	0.0734(12)
*O38	0.2463(18)	0.4695(14)	0.2069(17)	0.124(8)
*O39	0.331(3)	0.6587(14)	0.2160(17)	0.123(7)
O40	0.4079(15)	0.5947(11)	0.3764(9)	0.146(4)
*O41	0.4713(14)	0.5496(12)	0.2052(11)	0.075(4)
*O38'	0.233(2)	0.520(2)	0.238(2)	0.102(8)
*O39'	0.432(4)	0.662(2)	0.238(3)	0.165(14)
*O41'	0.452(2)	0.4916(17)	0.2513(18)	0.085(6)
C142	0.2947(3)	0.8554(3)	0.7812(2)	0.0708(11)
*O43	0.3199(16)	0.7484(9)	0.7605(11)	0.058(4)
O44	0.3848(10)	0.9199(7)	0.8852(7)	0.098(3)
*O45	0.3296(18)	0.9119(13)	0.7019(12)	0.083(5)
*O46	0.1524(14)	0.8334(15)	0.7837(15)	0.103(6)
*O43'	0.265(4)	0.747(3)	0.787(3)	0.154(15)
*O45'	0.374(2)	0.8785(19)	0.6987(19)	0.079(8)
*O46'	0.173(3)	0.884(2)	0.751(2)	0.114(10)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor
 Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

1.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O25	2.462(8)	N17	-C16	1.327(15)
Cu1	-O34	2.427(8)	N17	-C12	1.395(13)
Cu1	-N2	2.024(8)	N18	-C23	1.333(14)
Cu1	-N10	1.921(9)	N18	-C19	1.365(13)
Cu1	-N17	2.016(8)	N26	-C27	1.480(13)
Cu1	-N18	2.020(9)	N26	-C24	1.292(16)
C137	-O41'	1.45(2)	N33	-C28	1.362(15)
C137	-O38	1.462(19)	N33	-C32	1.320(15)
C137	-O39	1.45(2)	N26	-H26	0.8597
C137	-O40	1.460(12)	N33	-H33	0.8602
C137	-O41	1.426(15)	C3	-C4	1.365(18)
C137	-O38'	1.30(2)	C4	-C5	1.407(19)
C137	-O39'	1.31(3)	C5	-C6	1.370(15)
C142	-O46'	1.36(3)	C6	-C7	1.359(16)
C142	-O43	1.459(13)	C7	-C8	1.463(14)
C142	-O44	1.433(9)	C11	-C12	1.500(16)
C142	-O45	1.404(16)	C12	-C13	1.351(15)
C142	-O46	1.405(16)	C13	-C14	1.367(18)

C142	-O43'	1.36(4)	C14	-C15	1.395(17)
C142	-O45'	1.51(2)	C15	-C16	1.352(16)
O9	-C8	1.277(14)	C19	-C20	1.397(18)
O25	-C24	1.265(15)	C20	-C21	1.329(19)
O34	-C35	1.418(16)	C21	-C22	1.397(16)
O34	-H34	1.01(11)	C22	-C23	1.361(17)
N2	-C3	1.330(14)	C23	-C24	1.503(14)
N2	-C7	1.412(14)	C27	-C28	1.457(14)
N10	-C11	1.421(13)	C28	-C29	1.396(17)
N10	-C8	1.286(14)	C29	-C30	1.343(17)
C30	-C31	1.42(2)	C20	-H20	0.9299
C31	-C32	1.370(19)	C21	-H21	0.9301
C35	-C36	1.48(2)	C22	-H22	0.9303
C3	-H3	0.9302	C27	-H27B	0.9699
C4	-H4	0.9299	C27	-H27A	0.9698
C5	-H5	0.9304	C29	-H29	0.9294
C6	-H6	0.9296	C30	-H30	0.9308
C11	-H11B	0.9701	C31	-H31	0.9309
C11	-H11A	0.9697	C32	-H32	0.9301
C13	-H13	0.9300	C35	-H35A	0.9693
C14	-H14	0.9307	C35	-H35B	0.9701
C15	-H15	0.9300	C36	-H36C	0.9598
C16	-H16	0.9296	C36	-H36A	0.9602
C19	-H19	0.9303	C36	-H36B	0.9597

1.4. Bond Angles (Degrees)

O25	-Cu1	-O34	164.9(3)	O43'	-C142	-O44	107.9(16)
O25	-Cu1	-N2	95.1(3)	O44	-C142	-O45	108.1(8)
O25	-Cu1	-N10	97.4(3)	O43	-C142	-O44	110.6(7)
O25	-Cu1	-N17	85.6(3)	O43	-C142	-O45	108.0(9)
O25	-Cu1	-N18	75.0(3)	O43	-C142	-O46	106.3(10)
O34	-Cu1	-N2	93.0(3)	O44	-C142	-O45'	108.2(10)
O34	-Cu1	-N10	96.4(3)	O44	-C142	-O46'	111.4(12)
O34	-Cu1	-N17	90.1(3)	O45	-C142	-O46	115.9(11)
O34	-Cu1	-N18	91.6(3)	O43'	-C142	-O45'	110.9(19)
N2	-Cu1	-N10	81.5(4)	O43'	-C142	-O46'	111(2)
N2	-Cu1	-N17	164.0(4)	O45'	-C142	-O46'	107.5(14)
N2	-Cu1	-N18	95.8(3)	Cu1	-O25	-C24	102.4(6)
N10	-Cu1	-N17	82.6(4)	Cu1	-O34	-C35	127.5(8)
N10	-Cu1	-N18	171.7(3)	C35	-O34	-H34	113(7)
N17	-Cu1	-N18	99.8(4)	Cu1	-O34	-H34	119(7)
O39	-C137	-O41	102.6(13)	Cu1	-N2	-C3	132.1(8)
O40	-C137	-O41	119.9(9)	Cu1	-N2	-C7	111.3(6)
O38'	-C137	-O40	99.0(13)	C3	-N2	-C7	116.5(9)
O38	-C137	-O39	106.3(13)	Cu1	-N10	-C8	118.4(7)
O38	-C137	-O40	114.6(10)	C8	-N10	-C11	124.0(9)
O38	-C137	-O41	102.7(10)	Cu1	-N10	-C11	117.6(7)
O39	-C137	-O40	109.4(10)	Cu1	-N17	-C16	130.2(7)
O39'	-C137	-O41'	111(2)	C12	-N17	-C16	115.9(9)
O40	-C137	-O41'	95.7(11)	Cu1	-N17	-C12	113.5(7)
O38'	-C137	-O39'	128(2)	Cu1	-N18	-C19	121.6(8)
O39'	-C137	-O40	101.2(17)	C19	-N18	-C23	118.1(9)
O38'	-C137	-O41'	114.1(14)	Cu1	-N18	-C23	119.7(6)
O44	-C142	-O46	107.9(9)	C24	-N26	-C27	122.4(10)
C28	-N33	-C32	125.7(11)	C22	-C23	-C24	122.1(10)
C27	-N26	-H26	118.77	N18	-C23	-C24	114.6(9)
C24	-N26	-H26	118.85	N26	-C24	-C23	117.9(10)
C32	-N33	-H33	117.12	O25	-C24	-N26	123.6(9)

C28	-N33	-H33	117.18	O25	-C24	-C23	118.5(10)
N2	-C3	-C4	124.5(12)	N26	-C27	-C28	111.2(8)
C3	-C4	-C5	118.3(11)	C27	-C28	-C29	125.5(11)
C4	-C5	-C6	118.7(11)	N33	-C28	-C29	115.5(9)
C5	-C6	-C7	120.6(11)	N33	-C28	-C27	119.0(10)
N2	-C7	-C8	112.9(9)	C28	-C29	-C30	121.3(12)
C6	-C7	-C8	125.7(10)	C29	-C30	-C31	120.1(12)
N2	-C7	-C6	121.3(9)	C30	-C31	-C32	118.4(11)
O9	-C8	-C7	117.7(9)	N33	-C32	-C31	118.9(12)
N10	-C8	-C7	115.7(10)	O34	-C35	-C36	113.5(12)
O9	-C8	-N10	126.6(9)	N2	-C3	-H3	117.77
N10	-C11	-C12	111.0(9)	C4	-C3	-H3	117.75
N17	-C12	-C13	119.9(10)	C3	-C4	-H4	120.82
C11	-C12	-C13	125.5(10)	C5	-C4	-H4	120.85
N17	-C12	-C11	114.5(9)	C4	-C5	-H5	120.61
C12	-C13	-C14	122.5(11)	C6	-C5	-H5	120.70
C13	-C14	-C15	117.9(11)	C7	-C6	-H6	119.72
C14	-C15	-C16	117.1(12)	C5	-C6	-H6	119.68
N17	-C16	-C15	126.6(11)	H11A	-C11	-H11B	108.00
N18	-C19	-C20	119.7(11)	N10	-C11	-H11A	109.42
C19	-C20	-C21	121.1(11)	N10	-C11	-H11B	109.45
C20	-C21	-C22	118.8(12)	C12	-C11	-H11A	109.44
C21	-C22	-C23	118.5(12)	C12	-C11	-H11B	109.42
N18	-C23	-C22	123.2(10)	C12	-C13	-H13	118.71
C14	-C13	-H13	118.76	C30	-C29	-H29	119.28
C13	-C14	-H14	121.09	C28	-C29	-H29	119.39
C15	-C14	-H14	121.02	C29	-C30	-H30	119.98
C16	-C15	-H15	121.40	C31	-C30	-H30	119.95
C14	-C15	-H15	121.51	C30	-C31	-H31	120.82
N17	-C16	-H16	116.77	C32	-C31	-H31	120.79
C15	-C16	-H16	116.66	N33	-C32	-H32	120.57
N18	-C19	-H19	120.13	C31	-C32	-H32	120.50
C20	-C19	-H19	120.13	O34	-C35	-H35A	108.84
C19	-C20	-H20	119.37	O34	-C35	-H35B	108.83
C21	-C20	-H20	119.52	H35A	-C35	-H35B	107.68
C20	-C21	-H21	120.56	C36	-C35	-H35B	108.85
C22	-C21	-H21	120.61	C36	-C35	-H35A	108.95
C21	-C22	-H22	120.74	C35	-C36	-H36B	109.48
C23	-C22	-H22	120.73	C35	-C36	-H36C	109.41
N26	-C27	-H27B	109.36	H36A	-C36	-H36C	109.51
C28	-C27	-H27A	109.38	H36B	-C36	-H36C	109.52
C28	-C27	-H27B	109.38	H36A	-C36	-H36B	109.48
H27A	-C27	-H27B	108.09	C35	-C36	-H36A	109.42
N26	-C27	-H27A	109.32				

1.5. Torsion Angles (Degrees)

N2-Cu1-O25-C24	-115.2(6)	C3-N2-C7-C8	178.3(9)
N10-Cu1-O25-C24	162.7(6)	Cu1-N2-C7-C6	178.0(8)
N17-Cu1-O25-C24	80.8(6)	Cu1-N2-C7-C8	-4.5(11)
N18-Cu1-O25-C24	-20.5(6)	C3-N2-C7-C6	0.9(15)
O25-Cu1-N2-C3	83.3(10)	C7-N2-C3-C4	-2.5(16)
O34-Cu1-N2-C3	-83.9(10)	Cu1-N10-C11-C12	7.8(11)
N2-Cu1-O34-C35	169.9(10)	C11-N10-C8 -C7	-180.0(9)
N10-Cu1-O34-C35	-108.3(10)	C11-N10-C8 -O9	2.4(17)
N17-Cu1-O34-C35	-25.8(10)	C8-N10-C11-C12	-172.5(9)
N18-Cu1-O34-C35	74.0(10)	Cu1-N10-C8-C7	-0.3(12)
N10-Cu1-N17-C12	-2.1(7)	Cu1-N10-C8-O9	-177.9(8)
N18-Cu1 -N2-C7	-168.6(7)	Cu1-N17-C16-C15	171.7(9)

O3-Cu1-N10-C8	-93.9(8)	Cu1-N18-C23-C22	-165.7(9)
N10-Cu1-N2-C3	-179.9(10)	C19-N18-C23-C24	-176.6(9)
N18-Cu1-N2-C3	8.0(10)	C24-N26-C27-C28	101.8(12)
O25-Cu1-N2-C7	-93.3(7)	C27-N26-C24-C23	175.5(9)
O34-Cu1-N2-C7	99.5(7)	C27-N26-C24-O25	-4.6(15)
N10-Cu1-N2-C7	3.5(7)	C32-N33-C28-C27	-178.3(11)
O25-Cu1-N10-C8	92.2(8)	C32-N33-C28-C29	0.9(16)
O34-Cu1-N17-C12	-98.6(7)	C28-N33-C32-C31	-2.7(18)
N2-Cu1-N10-C8	-1.8(8)	N2-C3-C4-C5	2.5(19)
N17-Cu1-N10-C8	176.8(8)	C3-C4-C5-C6	-0.9(18)
O25-Cu1-N18-C19	-167.8(8)	C4-C5-C6-C7	-0.5(17)
O34-Cu1-N18-C19	19.1(8)	C5-C6-C7-N2	0.6(17)
N2-Cu1-N18-C19	-74.1(8)	C5-C6-C7-C8	-176.5(11)
N17-Cu1-N10-C11	-3.4(7)	N2-C7-C8-O9	-178.8(9)
O25-Cu1-N10-C11	-88.0(7)	N2-C7-C8-N10	3.3(13)
N17-Cu1-N18-C19	109.5(8)	C6-C7-C8-O9	-1.5(16)
N18-Cu1-N17-C12	169.8(7)	C6-C7-C8-N10	-179.4(10)
O25-Cu1-N17-C12	95.9(7)	N10-C11-C12-N17	-9.4(12)
O34-Cu1-N10-C11	85.8(7)	N10-C11-C12-C13	171.6(10)
N2-Cu1-N10-C11	177.9(8)	N17-C12-C13-C14	0.4(17)
N10-Cu1-N17-C16	-175.8(9)	C11-C12-C13-C14	179.4(11)
O25-Cu1-N17-C16	-77.7(9)	C12-C13-C14-C15	-0.3(18)
O34-Cu1-N17-C16	87.8(9)	C13-C14-C15-C16	-0.8(17)
O34-Cu1-N18-C23	-169.0(7)	C14-C15-C16-N17	1.9(18)
N18-Cu1-N17-C16	-3.8(9)	N18-C19-C20-C21	4.4(19)
O25-Cu1-N18-C23	4.1(7)	C19-C20-C21-C22	-3.3(19)
N2-Cu1-N18-C23	97.8(8)	C20-C21-C22-C23	3.7(18)
N17-Cu1-N18-C23	-78.7(8)	C21-C22-C23-N18	-5.5(18)
Cu1-O25-C24-C23	33.4(10)	C21-C22-C23-C24	177.9(11)
Cu1-O25-C24-N26	-146.6(9)	N18-C23-C24-O25	-34.4(13)
Cu1-O34-C35-C36	-159.1(10)	N18-C23-C24-N26	145.5(10)
Cu1-N2-C3-C4	-178.9(9)	C22-C23-C24-O25	142.5(11)
C12-N17-C16-C15	-1.8(16)	C22-C23-C24-N26	-37.6(15)
C16-N17-C12-C11	-178.5(9)	N26-C27-C28-N33	68.6(13)
Cu1-N17-C1-C11	6.9(11)	N26-C27-C28-C29	-110.5(12)
Cu1-N17-C12-C13	-174.0(8)	N33-C28-C29-C30	0.8(17)
C16-N17-C12-C13	0.6(15)	C27-C28-C29-C30	180(3)
Cu1-N18-C19-C20	166.3(9)	C28-C29-C30-C31	-0.6(19)
C23-N18-C19-C20	-5.7(16)	C29-C30-C31-C32	-1.1(19)
Cu1-N18-C23-C24	11.2(12)	C30-C31-C32-N33	2.7(18)
C19-N18-C23-C22	6.5(16)		

2. C01-XOSNUO

2.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

	<u>Crystal Data</u>		
Empirical Formula	C ₂₄ H ₁₈ Cu N ₆ O ₂ , 2(ClO ₄), 2(H ₂ O)		
Formula Weight	720.93		
Crystal System	Monoclinic		
Space group	P2 ₁ /n (No. 14)		
a, b, c [Angstrom]	12.8450(10)	10.2010(10)	23.008(5)
alpha, beta, gamma [deg]	90	101.487(11)	90

V [Ang ³]	2954.4(7)
Z	4
D(calc) [g/cm ³]	0.000, 1.621
F(000)	1468
μ (CuK α) [/mm]	3.4
Crystal Size [mm]	0.07 x 0.15 x 0.47

Data Collection

Temperature (K)	293
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54174
Theta Min-Max [Deg]	3.7, 71.9
Dataset	-15: 9 ; -12: 0 ; -27: 28
Tot., Uniq. Data, R(int)	7447, 5806, 0.039
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	4643

Refinement

Refinement method	on F ²
Nref, Npar	5806, 415
R, wR, S	0.0757, 0.2353, 1.08
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.81, 1.16

2.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
Cu1	0.78204(5)	0.13923(6)	0.08008(3)	0.0413(2)
O9	0.8661(3)	0.4999(3)	0.04068(18)	0.0645(13)
O25	0.8931(3)	-0.0150(3)	0.05341(14)	0.0456(10)
N2	0.8930(3)	0.2291(4)	0.14099(17)	0.0438(11)
N10	0.7842(3)	0.3004(4)	0.03883(18)	0.0500(11)
N17	0.6730(3)	0.0946(4)	0.00506(17)	0.0488(12)
N18	0.7629(3)	-0.0153(3)	0.13056(15)	0.0387(10)
N26	0.8995(3)	-0.2337(4)	0.05161(18)	0.0475(11)
N33	0.8557(5)	-0.1519(5)	-0.0981(2)	0.0722(19)
C3	0.9486(4)	0.1840(5)	0.1910(2)	0.0542(17)
C4	1.0290(5)	0.2564(6)	0.2268(3)	0.0634(19)
C5	1.0506(4)	0.3796(5)	0.2067(3)	0.0585(17)
C6	0.9945(4)	0.4268(5)	0.1539(2)	0.0566(16)
C7	0.9150(4)	0.3506(4)	0.1213(2)	0.0465(14)
C8	0.8502(4)	0.3889(4)	0.0624(2)	0.0456(12)
C11	0.7125(5)	0.3165(5)	-0.0168(2)	0.0596(17)
C12	0.6584(4)	0.1904(6)	-0.0357(2)	0.0555(17)
C13	0.6003(5)	0.1701(7)	-0.0921(3)	0.075(2)
C14	0.5601(6)	0.0472(9)	-0.1073(3)	0.090(3)
C15	0.5736(5)	-0.0518(8)	-0.0659(3)	0.077(2)
C16	0.6306(4)	-0.0226(6)	-0.0093(3)	0.0598(17)
C19	0.7062(4)	-0.0071(5)	0.1737(2)	0.0480(14)
C20	0.6956(5)	-0.1131(6)	0.2093(2)	0.0606(17)
C21	0.7404(5)	-0.2299(6)	0.1991(3)	0.0667(19)
C22	0.7991(5)	-0.2375(5)	0.1552(2)	0.0575(16)
C23	0.8096(3)	-0.1285(4)	0.12161(18)	0.0384(11)
C24	0.8722(3)	-0.1218(4)	0.07278(19)	0.0383(11)
C27	0.9532(4)	-0.2383(5)	0.0016(2)	0.0497(16)
C28	0.8713(4)	-0.2479(4)	-0.0555(2)	0.0461(16)
C29	0.8100(4)	-0.3552(4)	-0.0632(2)	0.0442(12)
C30	0.7360(5)	-0.3742(6)	-0.1100(3)	0.070(2)
C31	0.7165(5)	-0.2811(8)	-0.1553(3)	0.076(2)

C32	0.7776(5)	-0.1695(6)	-0.1488(3)	0.070(2)
C141	1.15608(13)	0.7644(2)	0.16566(8)	0.0822(6)
O42	1.1396(8)	0.8145(14)	0.1081(4)	0.193(6)
O43	1.2314(8)	0.8531(10)	0.1939(5)	0.198(5)
O44	1.0654(7)	0.7559(14)	0.1868(4)	0.200(6)
*O45A	1.2145(13)	0.6575(11)	0.1840(9)	0.203(8)
*O45B	1.1328(13)	0.669(2)	0.1167(8)	0.099(7)
C136	0.58832(13)	0.42102(17)	0.13779(8)	0.0764(5)
O37	0.6066(9)	0.2876(7)	0.1385(5)	0.182(5)
O38	0.6871(6)	0.4804(7)	0.1424(4)	0.144(3)
O39	0.5434(7)	0.4566(11)	0.1839(5)	0.181(5)
O40	0.5238(9)	0.4487(15)	0.0847(4)	0.230(7)
O34	0.3758(7)	0.3318(7)	-0.0175(4)	0.135(3)
O35	0.9764(7)	0.6427(7)	0.2709(4)	0.138(3)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor
 Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

2.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O25	2.288(4)	N33	-C28	1.372(6)
Cu1	-N2	2.010(4)	N26	-H26	0.8600
Cu1	-N10	1.901(4)	N33	-H33	0.8602
Cu1	-N17	2.046(4)	C3	-C4	1.397(8)
Cu1	-N18	2.002(3)	C4	-C5	1.386(8)
C141	-O45B	1.474(19)	C5	-C6	1.370(8)
C141	-O43	1.388(11)	C6	-C7	1.380(7)
C141	-O44	1.351(9)	C7	-C8	1.494(6)
C141	-O42	1.396(10)	C11	-C12	1.485(8)
C141	-O45A	1.343(14)	C12	-C13	1.378(8)
C136	-O39	1.354(11)	C13	-C14	1.374(11)
C136	-O40	1.362(10)	C14	-C15	1.375(11)
C136	-O38	1.391(8)	C15	-C16	1.393(9)
C136	-O37	1.381(8)	C19	-C20	1.380(7)
O9	-C8	1.271(5)	C20	-C21	1.364(9)
O25	-C24	1.227(5)	C21	-C22	1.378(9)
O42	-O45B	1.50(2)	C22	-C23	1.376(6)
N2	-C7	1.368(6)	C23	-C24	1.508(6)
N2	-C3	1.311(6)	C27	-C28	1.514(7)
N10	-C8	1.282(6)	C28	-C29	1.339(6)
N10	-C11	1.430(6)	C29	-C30	1.301(8)
N17	-C12	1.342(7)	C30	-C31	1.395(10)
N17	-C16	1.328(7)	C31	-C32	1.374(10)
N18	-C19	1.346(6)	C3	-H3	0.9302
N18	-C23	1.336(5)	C4	-H4	0.9300
N26	-C27	1.455(6)	C5	-H5	0.9289
N26	-C24	1.316(6)	C6	-H6	0.9301
N33	-C32	1.390(8)	C11	-H11A	0.9697
C11	-H11B	0.9707	C22	-H22	0.9303
C13	-H13	0.9301	C27	-H27A	0.9701
C14	-H14	0.9310	C27	-H27B	0.9694
C15	-H15	0.9302	C29	-H29	0.9306
C16	-H16	0.9297	C30	-H30	0.9303
C19	-H19	0.9299	C31	-H31	0.9286
C20	-H20	0.9308	C32	-H32	0.9299
C21	-H21	0.9307			

2.4. Bond Angles (Degrees)

O25	-Cu1	-N2	96.15(15)	Cu1	-N2	-C7	110.3(3)
O25	-Cu1	-N10	112.88(15)	Cu1	-N2	-C3	129.7(3)
O25	-Cu1	-N17	88.82(14)	C3	-N2	-C7	119.7(4)
O25	-Cu1	-N18	76.66(13)	Cu1	-N10	-C11	118.4(3)
N2	-Cu1	-N10	82.81(17)	C8	-N10	-C11	123.5(4)
N2	-Cu1	-N17	163.94(16)	Cu1	-N10	-C8	118.1(3)
N2	-Cu1	-N18	96.12(15)	Cu1	-N17	-C12	113.9(3)
N10	-Cu1	-N17	81.19(17)	C12	-N17	-C16	119.2(5)
N10	-Cu1	-N18	170.45(16)	Cu1	-N17	-C16	126.0(4)
N17	-Cu1	-N18	99.89(15)	Cu1	-N18	-C19	121.7(3)
O43	-Cl41	-O44	116.3(7)	C19	-N18	-C23	119.5(4)
O43	-Cl41	-O45A	95.1(8)	Cu1	-N18	-C23	118.7(3)
O43	-Cl41	-O45B	143.6(8)	C24	-N26	-C27	121.6(4)
O42	-Cl41	-O43	99.5(7)	C28	-N33	-C32	119.1(5)
O42	-Cl41	-O44	112.7(6)	C24	-N26	-H26	119.25
O42	-Cl41	-O45A	124.4(10)	C27	-N26	-H26	119.16
O42	-Cl41	-O45B	63.1(9)	C32	-N33	-H33	120.42
O44	-Cl41	-O45A	107.6(9)	C28	-N33	-H33	120.53
O44	-Cl41	-O45B	100.1(8)	N2	-C3	-C4	122.8(5)
O38	-Cl36	-O39	110.4(6)	C3	-C4	-C5	117.1(6)
O37	-Cl36	-O39	110.7(7)	C4	-C5	-C6	120.6(5)
O37	-Cl36	-O40	106.7(8)	C5	-C6	-C7	119.0(5)
O39	-Cl36	-O40	111.6(7)	N2	-C7	-C6	120.6(4)
O37	-Cl36	-O38	106.1(6)	N2	-C7	-C8	115.0(4)
O38	-Cl36	-O40	111.2(7)	C6	-C7	-C8	124.3(4)
Cu1	-O25	-C24	108.7(3)	O9	-C8	-C7	119.1(4)
Cl41	-O42	-O45B	61.0(9)	N10	-C8	-C7	113.7(4)
Cl41	-O45B	-O42	55.9(8)	O9	-C8	-N10	127.3(5)
N10	-C11	-C12	110.1(4)	C5	-C4	-H4	121.42
N17	-C12	-C11	115.7(4)	C3	-C4	-H4	121.44
N17	-C12	-C13	121.5(6)	C6	-C5	-H5	119.64
C11	-C12	-C13	122.7(5)	C4	-C5	-H5	119.74
C12	-C13	-C14	118.8(6)	C7	-C6	-H6	120.41
C13	-C14	-C15	120.3(7)	C5	-C6	-H6	120.55
C14	-C15	-C16	117.4(7)	C12	-C11	-H11A	109.68
N17	-C16	-C15	122.6(6)	N10	-C11	-H11A	109.66
N18	-C19	-C20	121.4(5)	N10	-C11	-H11B	109.66
C19	-C20	-C21	119.2(5)	H11A	-C11	-H11B	108.09
C20	-C21	-C22	119.1(6)	C12	-C11	-H11B	109.66
C21	-C22	-C23	119.7(5)	C14	-C13	-H13	120.60
N18	-C23	-C24	113.5(3)	C12	-C13	-H13	120.56
C22	-C23	-C24	125.6(4)	C13	-C14	-H14	119.84
N18	-C23	-C22	121.0(4)	C15	-C14	-H14	119.87
O25	-C24	-N26	122.8(4)	C14	-C15	-H15	121.18
O25	-C24	-C23	119.9(4)	C16	-C15	-H15	121.39
N26	-C24	-C23	117.2(4)	C15	-C16	-H16	118.68
N26	-C27	-C28	109.3(4)	N17	-C16	-H16	118.76
N33	-C28	-C27	123.5(4)	N18	-C19	-H19	119.35
C27	-C28	-C29	117.1(4)	C20	-C19	-H19	119.24
N33	-C28	-C29	119.4(5)	C21	-C20	-H20	120.41
C28	-C29	-C30	123.0(5)	C19	-C20	-H20	120.40
C29	-C30	-C31	120.6(6)	C20	-C21	-H21	120.40
C30	-C31	-C32	118.0(6)	C22	-C21	-H21	120.48
N33	-C32	-C31	120.0(6)	C21	-C22	-H22	120.29
N2	-C3	-H3	118.60	C23	-C22	-H22	120.01
C4	-C3	-H3	118.61	N26	-C27	-H27B	109.72
C28	-C27	-H27A	109.84	C31	-C30	-H30	119.67
H27A	-C27	-H27B	108.21	C29	-C30	-H30	119.69
C28	-C27	-H27B	109.90	C30	-C31	-H31	120.98

N26	-C27	-H27A	109.80	C32	-C31	-H31	121.05
C28	-C29	-H29	118.52	C31	-C32	-H32	119.99
C30	-C29	-H29	118.48	N33	-C32	-H32	120.05

2.5. Torsion Angles (Degrees)

O25-Cu1-N2-C3	-64.1(4)	Cu1-N17-C16-C15	-166.8(4)
O25-Cu1-N2-C7	109.8(3)	C12-N17-C16-C15	1.9(8)
N10-Cu1-N2-C3	-176.5(5)	Cu1-N18-C19-C20	-178.3(4)
N10-Cu1-N2-C7	-2.6(3)	C23-N18-C19-C20	0.4(7)
N18-Cu1-N2-C3	13.1(4)	Cu1-N18-C23-C22	179.9(3)
N18-Cu1-N2-C7	-173.0(3)	Cu1-N18-C23-C24	0.0(5)
O25-Cu1-N10-C8	-91.3(4)	C19-N18-C23-C22	1.1(7)
O25-Cu1-N10-C11	88.5(4)	C19-N18-C23-C24	-178.7(4)
N2-Cu1-N10-C8	2.3(4)	C27-N26-C24-O25	-2.6(7)
N2-Cu1-N10-C11	-177.8(4)	C27-N26-C24-C23	175.5(4)
N17-Cu1-N10-C8	-176.3(4)	C24-N26-C27-C28	-91.0(5)
N17-Cu1-N10-C11	3.6(4)	C32-N33-C28-C27	-179.3(5)
O25-Cu1-N17-C12	-111.1(3)	C32-N33-C28-C29	-1.1(8)
O25-Cu1-N17-C16	58.1(4)	C28-N33-C32-C31	0.8(9)
N10-Cu1-N17-C12	2.2(4)	N2-C3-C4-C5	-1.5(9)
N10-Cu1-N17-C16	171.5(5)	C3-C4-C5-C6	0.1(11)
N18-Cu1-N17-C12	172.6(3)	C4-C5-C6-C7	0.9(8)
N18-Cu1-N17-C16	-18.1(4)	C5-C6-C7-N2	-0.6(7)
O25-Cu1-N18-C19	172.2(4)	C5-C6-C7-C8	-178.2(5)
O25-Cu1-N18-C23	-6.5(3)	C6-C7-C8-O9	-1.9(8)
N2-Cu1-N18-C19	77.3(4)	C6-C7-C8-N10	176.9(5)
N2-Cu1-N18-C23	-101.4(3)	N2-C7-C8-O9	-179.5(4)
N17-Cu1-N18-C19	-101.4(4)	N2-C7-C8-N10	-0.8(6)
N17-Cu1-N18-C23	79.9(3)	N10-C11-C12-N17	9.8(7)
N2-Cu1-O25-C24	108.2(3)	N10-C11-C12-C13	-167.7(5)
N10-Cu1-O25-C24	-167.1(3)	N17-C12-C13-C14	-2.5(9)
N17-Cu1-O25-C24	-87.1(3)	C11-C12-C13-C14	174.7(6)
N18-Cu1-O25-C24	13.3(3)	C12-C13-C14-C15	3.0(11)
Cu1-O25-C24-N26	160.1(3)	C13-C14-C15-C16	-1.2(11)
Cu1-O25-C24-C23	-17.8(5)	C14-C15-C16-N17	-1.3(9)
Cu1-N2-C3-C4	175.2(4)	N18-C19-C20-C21	-2.4(8)
C7-N2-C3-C4	1.8(8)	C19-C20-C21-C22	2.9(9)
Cu1-N2-C7-C6	-175.3(4)	C20-C21-C22-C23	-1.4(9)
Cu1-N2-C7-C8	2.5(5)	C21-C22-C23-C24	179.2(5)
C3-N2-C7-C6	-0.7(7)	C21-C22-C23-N18	-0.6(8)
C3-N2-C7-C8	177.1(4)	C22-C23-C24-N26	15.8(7)
Cu1-N10-C8-O9	177.1(4)	C22-C23-C24-O25	-166.1(5)
Cu1-N10-C8-C7	-1.5(6)	N18-C23-C24-O25	13.7(6)
C11-N10-C8-O9	-2.8(8)	N18-C23-C24-N26	-164.4(4)
C11-N10-C8-C7	178.6(5)	N26-C27-C28-N33	115.1(6)
Cu1-N10-C11-C12	-8.0(6)	N26-C27-C28-C29	-63.2(6)
C8-N10-C11-C12	171.8(5)	N33-C28-C29-C30	0.8(8)
Cu1-N17-C12-C11	-7.3(6)	C27-C28-C29-C30	179.2(6)
Cu1-N17-C12-C13	170.1(4)	C28-C29-C30-C31	-0.2(9)
C16-N17-C12-C11	-177.4(5)	C29-C30-C31-C32	-0.1(10)
C16-N17-C12-C13	0.1(8)	C30-C31-C32-N33	-0.3(10)

3. C02

3.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

<u>Crystal Data</u>				
Empirical Formula	C ₁₂	H ₁₄	Cu _{0.5}	N ₃ O _{1.5} P _{1.5} F ₉
Formula Weight	473.49			
Crystal System	Monoclinic			
Space group	P2/a (No. 13)			
a, b, c [Angstrom]	13.577(3)	8.6920(10)	15.108(2)	
alpha, beta, gamma [deg]	90	106.740(15)	90	
V [Ang ³]	1707.4(5)			
Z	4			
D(calc) [g/cm ³]	1.836			
F(000)	942			
μ (CuK α) [/mm]	3.5			
Crystal Size [mm]	0.15 x	0.13 x	0.05	

<u>Data Collection</u>				
Temperature (K)	293			
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178			
Theta Min-Max [Deg]	3.0, 71.8			
Dataset	-16: 15 ;	0: 10 ;	0: 18	
Tot., Uniq. Data, R(int)	3316,	3316,	0.000	
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3104			

<u>Refinement</u>				
Refinement method	on F ²			
Nref, Npar	3316, 252			
R, wR, S	0.0695,	0.2064,	1.08	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00			
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-1.38, 1.02			

3.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
Cu1	3/4	0.31645(8)	1/2	0.0336(3)
O9	0.83703(17)	0.3490(3)	0.62790(15)	0.0377(7)
O18	3/4	0.0594(6)	1/2	0.100(3)
N2	0.6390(2)	0.3204(3)	0.56005(19)	0.0351(8)
N10	0.8313(2)	0.3697(4)	0.77460(18)	0.0367(8)
N17	1.0706(2)	0.2975(3)	0.94435(19)	0.0329(8)
C3	0.5379(3)	0.2995(5)	0.5189(2)	0.0456(13)
C4	0.4678(3)	0.2834(6)	0.5695(3)	0.0545(13)
C5	0.5032(3)	0.2904(5)	0.6645(3)	0.0490(13)
C6	0.6076(3)	0.3127(5)	0.7073(2)	0.0416(10)
C7	0.6726(2)	0.3272(4)	0.6522(2)	0.0296(8)
C8	0.7872(2)	0.3497(4)	0.6861(2)	0.0296(8)
C11	0.9413(2)	0.3999(4)	0.8112(2)	0.0380(9)
C12	0.9975(2)	0.2648(4)	0.8664(2)	0.0317(8)
C13	0.9805(3)	0.1119(4)	0.8390(3)	0.0466(11)
C14	1.0414(3)	-0.0020(4)	0.8939(3)	0.0530(13)
C15	1.1144(3)	0.0359(5)	0.9740(3)	0.0505(13)
C16	1.1286(3)	0.1891(4)	0.9992(3)	0.0437(11)

P5	3/4	0.38296(13)	1	0.0337(4)
F51	0.7511(2)	0.5205(3)	0.92177(16)	0.0562(8)
F52	0.74969(19)	0.2475(2)	0.92146(13)	0.0457(7)
F53	0.88149(17)	0.3869(3)	1.03306(19)	0.0564(8)
P6	0.28147(7)	0.18069(11)	0.29232(7)	0.0421(3)
F61	0.3765(2)	0.0962(4)	0.3592(3)	0.0940(11)
F62	0.1821(2)	0.2638(4)	0.2270(2)	0.0775(10)
F63	0.3541(3)	0.3062(5)	0.2705(4)	0.1154(19)
F64	0.2695(3)	0.2823(5)	0.3759(2)	0.0977(14)
F65	0.2061(3)	0.0560(5)	0.3168(2)	0.0986(14)
F66	0.2881(3)	0.0799(5)	0.2089(2)	0.1076(18)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

3.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O9	1.974(2)	N17	-H17	0.8601
Cu1	-O18	2.234(5)	C3	-C4	1.389(6)
Cu1	-N2	1.971(3)	C4	-C5	1.377(6)
P5	-F52	1.671(2)	C5	-C6	1.392(6)
P5	-F53	1.710(3)	C6	-C7	1.382(5)
P5	-F51	1.684(3)	C7	-C8	1.504(4)
P6	-F62	1.597(3)	C11	-C12	1.513(5)
P6	-F63	1.568(5)	C12	-C13	1.391(5)
P6	-F61	1.573(4)	C13	-C14	1.399(6)
P6	-F65	1.605(4)	C14	-C15	1.365(6)
P6	-F66	1.559(4)	C15	-C16	1.383(6)
P6	-F64	1.587(4)	C3	-H3	0.9303
O9	-C8	1.254(4)	C4	-H4	0.9300
O18	-H18	0.7777	C5	-H5	0.9293
N2	-C7	1.336(4)	C6	-H6	0.9294
N2	-C3	1.346(5)	C11	-H11B	0.9693
N10	-C11	1.459(4)	C11	-H11A	0.9703
N10	-C8	1.310(4)	C13	-H13	0.9296
N17	-C12	1.334(4)	C14	-H14	0.9299
N17	-C16	1.349(5)	C15	-H15	0.9300
N10	-H10	0.8598	C16	-H16	0.9301

3.4. Bond Angles (Degrees)

O9	-Cu1	-O18	98.24(8)	F65	-P6	-F66	89.8(2)
O9	-Cu1	-N2	82.43(11)	F62	-P6	-F65	88.09(18)
O9	-Cu1	-O9_b	163.52(11)	F62	-P6	-F66	89.42(19)
O9	-Cu1	-N2_b	97.28(11)	F61	-P6	-F64	90.1(2)
O18	-Cu1	-N2	91.00(8)	F61	-P6	-F65	89.78(19)
O9_b	-Cu1	-O18	98.24(8)	F61	-P6	-F66	91.7(2)
O18	-Cu1	-N2_b	91.00(8)	F62	-P6	-F63	91.5(2)
O9_b	-Cu1	-N2	97.28(11)	F62	-P6	-F64	88.74(18)
N2	-Cu1	-N2_b	178.00(12)	F63	-P6	-F65	178.2(2)
O9_b	-Cu1	-N2_b	82.43(11)	F63	-P6	-F66	92.0(3)
F53	-P5	-F53_a	177.70(15)	F63	-P6	-F64	89.7(3)
F51_a	-P5	-F52_a	90.03(11)	F64	-P6	-F65	88.5(2)
F51_a	-P5	-F53_a	88.35(13)	Cu1	-O9	-C8	113.3(2)
F52_a	-P5	-F53_a	90.60(13)	Cu1	-O18	-H18_b	117.56
F52	-P5	-F53	90.60(13)	Cu1	-O18	-H18	117.56
F51_a	-P5	-F52	179.25(11)	H18	-O18	-H18_b	124.87
F51	-P5	-F52	90.03(11)	Cu1	-N2	-C7	113.8(2)

F51	-P5	-F53	88.35(13)	C3	-N2	-C7	119.0(3)
F51	-P5	-F51_a	89.56(13)	Cu1	-N2	-C3	126.8(2)
F51	-P5	-F52_a	179.25(12)	C8	-N10	-C11	121.9(3)
F51	-P5	-F53_a	90.02(13)	C12	-N17	-C16	123.2(3)
F52	-P5	-F53_a	91.02(13)	C11	-N10	-H10	119.06
F51_a	-P5	-F53	90.02(13)	C8	-N10	-H10	119.09
F52	-P5	-F52_a	90.39(11)	C16	-N17	-H17	118.43
F52_a	-P5	-F53	91.02(13)	C12	-N17	-H17	118.34
F61	-P6	-F62	177.60(18)	N2	-C3	-C4	121.9(3)
F61	-P6	-F63	90.6(2)	C3	-C4	-C5	118.7(4)
F64	-P6	-F66	177.5(2)	C4	-C5	-C6	119.6(4)
C5	-C6	-C7	118.3(3)	C3	-C4	-H4	120.73
N2	-C7	-C6	122.6(3)	C4	-C5	-H5	120.25
N2	-C7	-C8	111.7(3)	C6	-C5	-H5	120.20
C6	-C7	-C8	125.7(3)	C7	-C6	-H6	120.81
N10	-C8	-C7	119.3(3)	C5	-C6	-H6	120.87
O9	-C8	-C7	118.3(3)	C12	-C11	-H11B	109.32
O9	-C8	-N10	122.4(3)	N10	-C11	-H11A	109.36
N10	-C11	-C12	111.6(3)	N10	-C11	-H11B	109.36
N17	-C12	-C13	118.9(3)	C12	-C11	-H11A	109.22
C11	-C12	-C13	124.3(3)	H11A	-C11	-H11B	107.93
N17	-C12	-C11	116.7(3)	C14	-C13	-H13	120.67
C12	-C13	-C14	118.7(4)	C12	-C13	-H13	120.61
C13	-C14	-C15	120.6(4)	C13	-C14	-H14	119.74
C14	-C15	-C16	119.0(4)	C15	-C14	-H14	119.66
N17	-C16	-C15	119.5(4)	C16	-C15	-H15	120.43
N2	-C3	-H3	119.04	C14	-C15	-H15	120.60
C4	-C3	-H3	119.05	C15	-C16	-H16	120.25
C5	-C4	-H4	120.57	N17	-C16	-H16	120.21

3.5. Torsion Angles (Degrees)

O18-Cu1-O9-C8	-86.7(2)	C16-N17-C12-C13	-0.9(5)
N2-Cu1-O9-C8	3.2(2)	C12-N17-C16-C15	1.3(6)
N2_b-Cu1-O9-C8	-178.8(2)	C16-N17-C12-C11	-178.3(3)
O9-Cu1-N2-C3	-177.7(3)	N2-C3-C4-C5	0.5(7)
O9-Cu1-N2-C7	-5.9(2)	C3-C4-C5-C6	-0.2(7)
O18-Cu1-N2-C3	-79.5(3)	C4-C5-C6-C7	0.0(6)
O18-Cu1-N2-C7	92.3(2)	C5-C6-C7-C8	-179.2(4)
O9_b-Cu1-N2-C3	18.9(3)	C5-C6-C7-N2	-0.1(6)
O9_b-Cu1-N2-C7	-169.2(2)	C6-C7-C8-N10	-5.7(6)
Cu1-O9-C8-N10	-180.0(3)	C6-C7-C8-O9	174.5(4)
Cu1-O9-C8-C7	-0.2(4)	N2-C7-C8-O9	-4.6(5)
C3-N2-C7-C8	179.6(3)	N2-C7-C8-N10	175.2(3)
Cu1-N2-C3-C4	170.9(3)	N10-C11-C12-C13	43.7(4)
C7-N2-C3-C4	-0.6(6)	N10-C11-C12-N17	-139.1(3)
Cu1-N2-C7-C6	-172.2(3)	N17-C12-C13-C14	-0.5(5)
Cu1-N2-C7-C8	7.0(4)	C11-C12-C13-C14	176.6(3)
C3-N2-C7-C6	0.4(5)	C12-C13-C14-C15	1.6(6)
C11-N10-C8-O9	3.0(6)	C13-C14-C15-C16	-1.2(6)
C8-N10-C11-C12	-110.4(4)	C14-C15-C16-N17	-0.2(6)
C11-N10-C8-C7	-176.8(3)		

4. C1

4.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

<u>Crystal Data</u>				
Empirical Formula	C ₁₇ H ₂₂ Cu _{0.5} N ₂ O ₅ , ClO ₄ ,CH ₄ O			
Formula Weight	497.63			
Crystal System	Triclinic			
Space group	P-1 (No. 2)			
a, b, c [Angstrom]	10.9740(10)	11.4210(10)	11.6980(10)	
alpha, beta, gamma [deg]	114.180(4)	93.573(5)	116.809(6)	
V [Ang ³]	1137.5(2)			
Z	2			
D(calc) [g/cm ³]	1.453			
F(000)	519			
μ(CuKα) [/mm]	2.5			
Crystal Size [mm]	0.20 x 0.25 x 0.35			
<u>Data Collection</u>				
Temperature (K)	293			
Radiation [Angstrom]	CuKα 1.54179			
Theta Min-Max [Deg]	4.3, 72.1			
Dataset	-13: 11 ; 0: 14 ; -14: 13			
Tot., Uniq. Data, R(int)	4473, 4473, 0.000			
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	4229			
<u>Refinement</u>				
Refinement method	on F ²			
Nref, Npar	4472, 326			
R, wR, S	0.0473, 0.1416, 1.08			
Max. and Av. Shift/Error	0.09, 0.01			
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.77, 0.45			

4.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
Cu1	1	1/2	1/2	0.0344(1)
O11	0.9906(2)	0.5286(2)	0.67516(14)	0.0391(4)
O18	0.9782(2)	0.7929(2)	0.9704(2)	0.0576(6)
O20	0.7331(2)	0.2199(2)	0.9067(2)	0.0627(7)
O22	0.7908(2)	0.2728(2)	0.7064(2)	0.0453(5)
O24	0.7497(2)	0.3007(2)	0.4070(2)	0.0712(7)
N2	0.9312(2)	0.6420(2)	0.5235(2)	0.0351(5)
N9	0.8329(2)	0.6085(2)	0.6906(2)	0.0375(5)
C3	0.9512(3)	0.7082(2)	0.4472(2)	0.0429(7)
C4	0.8920(3)	0.7907(3)	0.4460(2)	0.0472(7)
C5	0.8060(3)	0.8102(3)	0.5261(2)	0.0435(7)
C6	0.7874(2)	0.7457(2)	0.6055(2)	0.0403(6)
C7	0.8527(2)	0.6655(2)	0.6037(2)	0.0341(5)
C8	0.7385(3)	0.8996(3)	0.5275(3)	0.0607(12)
C10	0.9056(2)	0.5561(2)	0.7286(2)	0.0341(5)
C12	0.8792(2)	0.5331(2)	0.8425(2)	0.0364(6)
C13	0.9149(3)	0.6562(3)	0.9655(2)	0.0437(7)
C14	0.8868(3)	0.6314(3)	1.0693(2)	0.0546(10)

C15	0.8247(3)	0.4877(3)	1.0524(2)	0.0561(9)
C16	0.7904(2)	0.3650(3)	0.9323(2)	0.0474(8)
C17	0.8184(2)	0.3892(2)	0.8266(2)	0.0386(6)
C19	1.0554(3)	0.9252(3)	1.0954(3)	0.0664(9)
C21	0.6887(4)	0.1865(4)	1.0070(4)	0.0792(12)
C23	0.6435(3)	0.1748(3)	0.6316(3)	0.0642(9)
C25	0.6264(4)	0.2914(5)	0.3498(4)	0.0868(12)
C126	0.70999(8)	0.92664(8)	1.18527(7)	0.0671(2)
*O27	0.6131(14)	0.7773(8)	1.1598(11)	0.171(5)
*O27A	0.7606(16)	0.8536(17)	1.2181(12)	0.156(6)
*O28	0.8382(7)	0.9956(15)	1.2769(7)	0.163(4)
*O28A	0.8344(9)	1.0718(7)	1.2090(11)	0.141(4)
*O29	0.6343(12)	1.0002(10)	1.2368(15)	0.149(5)
*O29A	0.6237(17)	0.9550(18)	1.2494(19)	0.177(9)
O30	0.6902(7)	0.8895(6)	1.0560(4)	0.169(2)
O31	0.6312(2)	0.6437(3)	0.8170(2)	0.0688(7)
C32	0.5257(4)	0.5132(5)	0.8161(5)	0.1007(16)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor
 Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

4.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O11	1.9556(16)	N9	-C7	1.395(3)
Cu1	-O24	2.423(2)	N9	-H9	0.860(3)
Cu1	-N2	2.010(2)	C3	-C4	1.368(5)
C126	-O27	1.427(11)	C4	-C5	1.395(4)
C126	-O27A	1.344(19)	C5	-C6	1.377(4)
C126	-O28	1.367(9)	C5	-C8	1.504(5)
C126	-O28A	1.491(10)	C6	-C7	1.390(3)
C126	-O29	1.427(14)	C10	-C12	1.481(3)
C126	-O29A	1.32(2)	C12	-C13	1.406(3)
C126	-O30	1.365(4)	C12	-C17	1.388(3)
O11	-C10	1.239(3)	C13	-C14	1.378(4)
O18	-C19	1.421(4)	C14	-C15	1.380(5)
O18	-C13	1.366(4)	C15	-C16	1.387(3)
O20	-C16	1.364(4)	C16	-C17	1.397(3)
O20	-C21	1.425(5)	C3	-H3	0.929(4)
O22	-C23	1.422(4)	C4	-H4	0.930(4)
O22	-C17	1.374(3)	C6	-H6	0.930(3)
O24	-C25	1.410(5)	C8	-H8B	0.960(14)
O24	-H24	0.67(5)	C8	-H8A	0.960(9)
O27	-O27A	1.40(2)	C8	-H8C	0.96(2)
O27A	-O28	1.26(2)	C14	-H14	0.930(3)
O28	-O28A	1.409(17)	C15	-H15	0.930(4)
O29	-O29A	0.56(3)	C19	-H19C	0.960(18)
O31	-C32	1.411(7)	C19	-H19A	0.960(10)
O31	-H31	0.78(4)	C19	-H19B	0.960(7)
N2	-C3	1.358(3)	C21	-H21A	0.960(11)
N2	-C7	1.341(3)	C21	-H21C	0.960(15)
N9	-C10	1.340(3)	C21	-H21B	0.96(3)
C23	-H23A	0.960(11)	C25	-H25A	0.96(2)
C23	-H23C	0.962(19)	C32	-H32A	0.960(11)
C23	-H23B	0.961(11)	C32	-H32B	0.96(3)
C25	-H25C	0.96(3)	C32	-H32C	0.96(3)
C25	-H25B	0.959(18)			

4.4. Bond Angles (Degrees)

O11	-Cu1	-O24	89.89(8)	O28	-C126	-O29	109.8(7)
O11	-Cu1	-N2	89.16(9)	O28	-C126	-O29A	107.1(9)
O11	-Cu1	-O11_a	180.00	O28	-C126	-O30	125.8(6)
O11	-Cu1	-O24_a	90.11(8)	O27	-C126	-O27A	60.4(10)
O11	-Cu1	-N2_a	90.84(9)	O27	-C126	-O28	112.8(9)
O24	-Cu1	-N2	86.56(9)	O27	-C126	-O28A	167.4(8)
O11_a	-Cu1	-O24	90.11(8)	O27	-C126	-O29	101.8(8)
O24	-Cu1	-O24_a	180.00	O27	-C126	-O29A	82.2(11)
O24	-Cu1	-N2_a	93.44(9)	Cu1	-O11	-C10	125.51(17)
O11_a	-Cu1	-N2	90.84(9)	C13	-O18	-C19	118.4(2)
O24_a	-Cu1	-N2	93.44(9)	C16	-O20	-C21	117.6(3)
N2	-Cu1	-N2_a	180.00	C17	-O22	-C23	114.4(2)
O11_a	-Cu1	-O24_a	89.89(8)	Cu1	-O24	-C25	132.0(3)
O11_a	-Cu1	-N2_a	89.16(9)	Cu1	-O24	-H24	109(5)
O24_a	-Cu1	-N2_a	86.56(9)	C25	-O24	-H24	108(5)
O28A	-C126	-O29	90.3(7)	C126	-O27	-O27A	56.8(9)
O28A	-C126	-O29A	108.8(10)	C126	-O27A	-O28	63.2(10)
O28A	-C126	-O30	84.0(5)	C126	-O27A	-O27	62.8(9)
O29	-C126	-O29A	23.0(11)	O27	-O27A	-O28	122.1(16)
O29	-C126	-O30	108.2(7)	C126	-O28	-O27A	61.3(9)
O29A	-C126	-O30	122.4(9)	C126	-O28	-O28A	65.0(6)
O27	-C126	-O30	95.2(5)	O27A	-O28	-O28A	118.6(10)
O27A	-C126	-O28	55.5(9)	C126	-O28A	-O28	56.2(6)
O27A	-C126	-O28A	108.3(9)	C126	-O29	-O29A	67(3)
O27A	-C126	-O29	136.1(9)	C126	-O29A	-O29	90(3)
O27A	-C126	-O29A	114.9(11)	C32	-O31	-H31	108(4)
O27A	-C126	-O30	113.0(7)	C3	-N2	-C7	116.4(2)
O28	-C126	-O28A	58.9(8)	Cu1	-N2	-C7	123.07(17)
Cu1	-N2	-C3	120.22(19)	C12	-C17	-C16	120.3(2)
C7	-N9	-C10	128.6(2)	O22	-C17	-C12	118.6(2)
C10	-N9	-H9	115.7(3)	N2	-C3	-H3	118.3(3)
C7	-N9	-H9	115.7(3)	C4	-C3	-H3	118.3(3)
N2	-C3	-C4	123.4(3)	C3	-C4	-H4	120.0(4)
C3	-C4	-C5	119.9(3)	C5	-C4	-H4	120.0(4)
C4	-C5	-C8	121.7(3)	C5	-C6	-H6	119.8(3)
C6	-C5	-C8	121.4(3)	C7	-C6	-H6	120.0(3)
C4	-C5	-C6	116.9(3)	C5	-C8	-H8A	109.5(12)
C5	-C6	-C7	120.2(2)	C5	-C8	-H8B	109.5(5)
N2	-C7	-N9	120.4(2)	H8A	-C8	-H8B	109.3(15)
N9	-C7	-C6	116.7(2)	H8A	-C8	-H8C	109.5(18)
N2	-C7	-C6	123.0(2)	H8B	-C8	-H8C	109.6(16)
O11	-C10	-N9	124.0(2)	C5	-C8	-H8C	109.4(14)
O11	-C10	-C12	120.6(2)	C15	-C14	-H14	119.8(3)
N9	-C10	-C12	115.4(2)	C13	-C14	-H14	119.9(4)
C13	-C12	-C17	120.4(2)	C14	-C15	-H15	119.2(3)
C10	-C12	-C13	120.1(2)	C16	-C15	-H15	119.2(4)
C10	-C12	-C17	119.50(19)	O18	-C19	-H19A	109.5(8)
O18	-C13	-C14	125.8(2)	O18	-C19	-H19B	109.4(3)
C12	-C13	-C14	119.0(3)	H19A	-C19	-H19B	109.3(16)
O18	-C13	-C12	115.2(2)	H19A	-C19	-H19C	109.4(12)
C13	-C14	-C15	120.3(2)	H19B	-C19	-H19C	109.6(15)
C14	-C15	-C16	121.6(2)	O18	-C19	-H19C	109.5(8)
O20	-C16	-C15	126.0(2)	O20	-C21	-H21B	109.2(17)
O20	-C16	-C17	115.5(2)	O20	-C21	-H21C	109.4(15)
C15	-C16	-C17	118.4(3)	O20	-C21	-H21A	109.5(10)
O22	-C17	-C16	121.0(2)	H21A	-C21	-H21C	110(2)
H21B	-C21	-H21C	109.5(17)	O24	-C25	-H25A	109.2(13)
H21A	-C21	-H21B	110(3)	H25A	-C25	-H25C	110(2)

O22	-C23	-H23A	109.4(7)	H25B	-C25	-H25C	110(2)
O22	-C23	-H23B	109.5(9)	H25A	-C25	-H25B	110(2)
H23A	-C23	-H23B	109.4(15)	O31	-C32	-H32A	109.5(11)
H23A	-C23	-H23C	109.4(14)	O31	-C32	-H32B	109.6(18)
O22	-C23	-H23C	109.4(8)	O31	-C32	-H32C	109.3(15)
H23B	-C23	-H23C	109.7(12)	H32A	-C32	-H32B	109(3)
O24	-C25	-H25B	109.5(11)	H32A	-C32	-H32C	110(2)
O24	-C25	-H25C	109.4(12)	H32B	-C32	-H32C	109(3)

4.5. Torsion Angles (Degrees)

O11-Cu1-N2-C3	161.1(2)	O29-Cl26-O28A-O28	113.1(8)
O11-Cu1-N2-C7	-25.5(2)	Cu1-O11-Cl10-Cl12	162.48(17)
O24-Cu1-N2-C3	-109.0(2)	Cu1-O11-Cl10-N9	-18.1(3)
O24-Cu1-N2-C7	64.4(2)	Cl9-O18-Cl13-Cl12	-161.4(3)
O11_a-Cu1-N2-C3	-18.9(2)	Cl9-O18-Cl13-Cl14	17.4(5)
O11_a-Cu1-N2-C7	154.5(2)	C21-O20-Cl16-Cl15	7.7(5)
O24_a-Cu1-N2-C3	71.0(2)	C21-O20-Cl16-Cl17	-173.6(3)
O24_a-Cu1-N2-C7	-115.6(2)	C23-O22-Cl17-Cl16	76.3(3)
O24-Cu1-O11-Cl10	-56.1(2)	C23-O22-Cl17-Cl12	-105.7(3)
N2-Cu1-O11-Cl10	30.4(2)	Cl126-O27-O27A-O28	22.7(11)
O24_a-Cu1-O11-Cl10	123.9(2)	O27-O27A-O28-Cl126	-22.6(11)
N2_a-Cu1-O11-Cl10	-149.6(2)	O27-O27A-O28-O28A	-54.5(19)
O11_a-Cu1-O24-C25	-69.2(3)	Cl126-O27A-O28-O28A	-31.9(11)
O11-Cu1-O24-C25	110.8(3)	O27A-O28-O28A-Cl126	30.8(12)
N2-Cu1-O24-C25	21.7(3)	Cu1-N2-C7-N9	9.7(3)
N2_a-Cu1-O24-C25	-158.3(3)	C3-N2-C7-C6	3.5(3)
O28-Cl126-O29A-O29	100(3)	C7-N2-C3-C4	-2.3(4)
O30-Cl126-O29-O29A	132(3)	Cu1-N2-C3-C4	171.5(2)
O27-Cl126-O29A-O29	-148(3)	C3-N2-C7-N9	-176.6(2)
O27A-Cl126-O29A-O29	160(2)	Cu1-N2-C7-C6	-170.15(17)
O29-Cl126-O27A-O28	-83.0(14)	Cl10-N9-C7-N2	15.4(4)
O28A-Cl126-O29A-O29	38(3)	C7-N9-Cl10-Cl12	167.8(2)
O30-Cl126-O29A-O29	-57(3)	Cl10-N9-C7-C6	-164.7(2)
O28A-Cl126-O29-O29A	-144(3)	C7-N9-Cl10-O11	-11.7(4)
O30-Cl126-O27A-O28	118.7(7)	N2-C3-C4-C5	0.0(4)
O27-Cl126-O28-O27A	20.2(11)	C3-C4-C5-C6	1.2(4)
O27-Cl126-O28-O28A	169.3(8)	C3-C4-C5-C8	-179.8(3)
O27A-Cl126-O28-O28A	149.2(11)	C4-C5-C6-C7	0.0(4)
O28A-Cl126-O28-O27A	-149.2(11)	C8-C5-C6-C7	-179.1(2)
O29-Cl126-O28-O27A	133.0(10)	C5-C6-C7-N2	-2.4(4)
O29-Cl126-O28-O28A	-77.9(8)	C5-C6-C7-N9	177.7(2)
O29A-Cl126-O28-O27A	108.8(13)	O11-Cl10-Cl12-Cl17	-63.3(3)
O29A-Cl126-O28-O28A	-102.0(11)	N9-Cl10-Cl12-Cl17	117.2(3)
O30-Cl126-O28-O27A	-95.0(11)	O11-Cl10-Cl12-Cl13	117.0(3)
O30-Cl126-O28-O28A	54.1(9)	N9-Cl10-Cl12-Cl13	-62.5(3)
O27A-Cl126-O28A-O28	-26.4(8)	Cl10-Cl12-Cl13-O18	-2.3(4)
O29A-Cl126-O27A-O27	64.2(12)	Cl10-Cl12-Cl17-O22	3.1(3)
O29A-Cl126-O27A-O28	-94.3(13)	Cl10-Cl12-Cl13-Cl14	178.8(3)
O30-Cl126-O27A-O27	-82.7(9)	Cl17-Cl12-Cl13-O18	178.0(3)
O28-Cl126-O29-O29A	-87(3)	Cl17-Cl12-Cl13-Cl14	-0.9(5)
O27A-Cl126-O29-O29A	-27(3)	Cl13-Cl12-Cl17-O22	-177.2(3)
O27-Cl126-O29-O29A	32(3)	Cl13-Cl12-Cl17-Cl16	0.8(4)
O28-Cl126-O27-O27A	-19.1(9)	Cl10-Cl12-Cl17-Cl16	-178.9(2)
O29-Cl126-O27-O27A	-136.7(9)	Cl12-Cl13-Cl14-Cl15	0.1(5)
O29A-Cl126-O27-O27A	-124.4(11)	O18-Cl13-Cl14-Cl15	-178.7(3)
O30-Cl126-O27-O27A	113.5(8)	Cl13-Cl14-Cl15-Cl16	0.8(5)
O27-Cl126-O27A-O28	-158.5(11)	Cl14-Cl15-Cl16-Cl17	-0.8(5)
O28-Cl126-O27A-O27	158.5(11)	Cl14-Cl15-Cl16-O20	177.9(3)

O28A-C126-O27A-O27	-173.9(7)	C15-C16-C17-C12	0.0(4)
O28A-C126-O27A-O28	27.5(9)	C15-C16-C17-O22	178.0(3)
O29-C126-O27A-O27	75.5(13)	O20-C16-C17-O22	-0.8(4)
O29A-C126-O28A-O28	99.0(11)	O20-C16-C17-C12	-178.8(2)
O30-C126-O28A-O28	-138.7(6)		

5. C2

5.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

<u>Crystal Data</u>				
Empirical Formula	C ₁₈ H ₁₆ Cl Cu _{0.5} N ₂ O ₆			
Formula Weight	423.55			
Crystal System	Triclinic			
Space group	P-1 (No. 2)			
a, b, c [Angstrom]	8.5440(10)	8.8580(10)	13.7070(10)	
alpha, beta, gamma [deg]	88.050(5)	72.984(5)	64.944(4)	
V [Ang ³]	893.77(17)			
Z	2			
D(calc) [g/cm ³]	1.574			
F(000)	435			
μ(CuKα) [/mm]	2.9			
Crystal Size [mm]	0.05 x	0.13 x	0.35	
<u>Data Collection</u>				
Temperature (K)	293			
Radiation [Angstrom]	CuKα		1.54178	
Theta Min-Max [Deg]	3.4, 71.9			
Dataset	-9: 10 ; 0: 10 ; -16: 16			
Tot., Uniq. Data, R(int)	3518,		3518, 0.000	
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3232			
<u>Refinement</u>				
Refinement method	on F ²			
Nref, Npar	3518, 278			
R, wR, S	0.0432, 0.1135, 1.04			
Max. and Av. Shift/Error	0.07, 0.01			
Min. and Max. resd. dens. [e/Anq ³]	-1.01, 0.55			

5.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
Cu1	1	0	1	0.0370(2)
Cl24	1.00566(9)	-0.30461(10)	1.17371(7)	0.0722(3)
O13	0.8351(2)	0.1745(2)	1.10940(13)	0.0459(5)
O22	0.2689(3)	0.6302(3)	1.3855(2)	0.0831(10)
*O25A	0.9706(8)	-0.2359(7)	1.0876(4)	0.085(2)
O26	1.1887(3)	-0.3714(3)	1.1662(2)	0.0804(9)

*O27A	0.9135(15)	-0.3951(14)	1.2147(8)	0.102(4)
*O28	0.9232(7)	-0.1492(6)	1.2535(4)	0.1050(17)
N2	0.7593(2)	0.0630(2)	0.96375(13)	0.0338(5)
N14	0.5613(3)	0.3920(2)	1.16731(14)	0.0416(6)
C3	0.7269(3)	-0.0010(3)	0.8860(2)	0.0356(6)
C4	0.8536(3)	-0.1569(3)	0.8301(2)	0.0503(8)
C5	0.8226(4)	-0.2173(4)	0.7511(2)	0.0557(10)
C6	0.6633(4)	-0.1273(4)	0.7240(2)	0.0549(10)
C7	0.5346(3)	0.0188(4)	0.7792(2)	0.0505(9)
C8	0.5604(3)	0.0860(3)	0.8624(2)	0.0394(7)
C9	0.4279(3)	0.2326(3)	0.9242(2)	0.0455(7)
C10	0.4595(3)	0.2902(3)	1.0037(2)	0.0423(7)
C11	0.6282(3)	0.2029(3)	1.0202(2)	0.0341(6)
C12	0.6781(3)	0.2590(3)	1.1030(2)	0.0357(6)
C15	0.6024(4)	0.4501(3)	1.2522(2)	0.0478(8)
C16	0.5344(3)	0.3864(3)	1.3506(2)	0.0468(8)
C17	0.6408(4)	0.2314(4)	1.3756(2)	0.0616(12)
C18	0.5782(6)	0.1712(5)	1.4653(3)	0.0824(14)
C19	0.4106(7)	0.2649(6)	1.5304(3)	0.0842(16)
C20	0.2996(5)	0.4188(6)	1.5093(2)	0.0795(14)
C21	0.3617(4)	0.4816(4)	1.4172(2)	0.0578(10)
C23	0.0907(5)	0.7374(6)	1.4501(4)	0.120(2)
*O28A	1.0392(12)	-0.4317(11)	1.0696(8)	0.146(4)
*O25	0.9251(8)	-0.1612(9)	1.1415(7)	0.078(3)
*O27	0.909(3)	-0.361(3)	1.2488(16)	0.131(7)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor
 Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

5.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O13	1.9234(17)	C9	-C10	1.359(4)
Cu1	-O25A	2.443(6)	C10	-C11	1.401(4)
Cu1	-N2	2.0964(19)	C11	-C12	1.489(4)
Cu1	-O25	2.464(8)	C15	-C16	1.497(4)
C124	-O25A	1.363(6)	C16	-C21	1.390(4)
C124	-O26	1.390(3)	C16	-C17	1.386(4)
C124	-O27A	1.350(13)	C17	-C18	1.376(5)
C124	-O28	1.555(5)	C18	-C19	1.353(7)
C124	-O25	1.297(8)	C19	-C20	1.371(7)
C124	-O27	1.34(2)	C20	-C21	1.412(4)
C124	-O28A	1.727(10)	C4	-H4	0.930(4)
O13	-C12	1.257(3)	C5	-H5	0.929(4)
O22	-C21	1.352(4)	C6	-H6	0.929(4)
O22	-C23	1.431(6)	C7	-H7	0.930(4)
N2	-C3	1.371(3)	C9	-H9	0.930(4)
N2	-C11	1.331(3)	C10	-H10	0.930(4)
N14	-C12	1.312(3)	C15	-H15A	0.970(3)
N14	-C15	1.475(4)	C15	-H15B	0.971(5)
N14	-H14	0.860(3)	C17	-H17	0.930(5)
C3	-C4	1.409(4)	C18	-H18	0.930(6)
C3	-C8	1.430(4)	C19	-H19	0.930(6)
C4	-C5	1.362(4)	C20	-H20	0.930(6)
C5	-C6	1.408(5)	C23	-H23A	0.960(18)
C6	-C7	1.353(4)	C23	-H23B	0.96(2)
C7	-C8	1.417(4)	C23	-H23C	0.958(18)
C8	-C9	1.398(4)			

5.4. Bond Angles (Degrees)

O13	-Cu1	-O25A	97.85(14)	O26	-C124	-O27	113.6(11)
O13	-Cu1	-N2	80.86(7)	O26	-C124	-O28A	94.4(4)
O13	-Cu1	-O25	78.01(19)	Cu1	-O13	-C12	116.30(16)
O13	-Cu1	-O13_a	180.00	C21	-O22	-C23	118.3(3)
O13	-Cu1	-O25A_a	82.15(14)	Cu1	-O25	-C124	137.6(5)
O13	-Cu1	-N2_a	99.14(7)	Cu1	-O25A	-C124	134.3(4)
O13	-Cu1	-O25_a	101.99(19)	Cu1	-N2	-C3	130.89(16)
O25A	-Cu1	-N2	91.27(18)	Cu1	-N2	-C11	110.07(16)
O13_a	-Cu1	-O25A	82.15(14)	C3	-N2	-C11	118.3(2)
O25A	-Cu1	-O25A_a	180.00	C12	-N14	-C15	122.9(2)
O25A	-Cu1	-N2_a	88.73(18)	C12	-N14	-H14	118.5(3)
O25	-Cu1	-N2	94.1(2)	C15	-N14	-H14	118.5(2)
O13_a	-Cu1	-N2	99.14(7)	C4	-C3	-C8	118.4(2)
O25A_a	-Cu1	-N2	88.73(18)	N2	-C3	-C4	120.9(2)
N2	-Cu1	-N2_a	180.00	N2	-C3	-C8	120.7(2)
O25_a	-Cu1	-N2	85.94(19)	C3	-C4	-C5	120.4(3)
O13_a	-Cu1	-O25	101.99(19)	C4	-C5	-C6	121.2(3)
O25	-Cu1	-N2_a	85.94(19)	C5	-C6	-C7	120.0(3)
O25	-Cu1	-O25_a	180.00	C6	-C7	-C8	120.8(3)
O13_a	-Cu1	-O25A_a	97.85(14)	C7	-C8	-C9	122.7(3)
O13_a	-Cu1	-N2_a	80.86(7)	C3	-C8	-C7	119.0(2)
O13_a	-Cu1	-O25_a	78.01(19)	C3	-C8	-C9	118.3(2)
O25A_a	-Cu1	-N2_a	91.27(18)	C8	-C9	-C10	120.1(3)
O25_a	-Cu1	-N2_a	94.06(19)	C9	-C10	-C11	118.8(2)
O25A	-C124	-O26	112.9(3)	N2	-C11	-C10	123.7(2)
O26	-C124	-O27A	117.8(6)	N2	-C11	-C12	113.5(2)
O26	-C124	-O28	101.9(3)	C10	-C11	-C12	122.9(2)
O25	-C124	-O26	121.6(4)	N14	-C12	-C11	120.9(3)
O13	-C12	-C11	117.9(2)	C10	-C9	-H9	120.0(3)
O13	-C12	-N14	121.3(3)	C9	-C10	-H10	120.6(3)
N14	-C15	-C16	111.4(2)	C11	-C10	-H10	120.6(3)
C15	-C16	-C17	120.7(2)	N14	-C15	-H15A	109.4(3)
C15	-C16	-C21	120.0(2)	N14	-C15	-H15B	109.4(3)
C17	-C16	-C21	119.3(3)	C16	-C15	-H15A	109.3(3)
C16	-C17	-C18	121.0(3)	C16	-C15	-H15B	109.3(3)
C17	-C18	-C19	119.6(4)	H15A	-C15	-H15B	108.0(4)
C18	-C19	-C20	121.8(4)	C16	-C17	-H17	119.5(3)
C19	-C20	-C21	119.2(4)	C18	-C17	-H17	119.5(4)
O22	-C21	-C16	114.6(3)	C17	-C18	-H18	120.2(5)
O22	-C21	-C20	126.3(3)	C19	-C18	-H18	120.2(5)
C16	-C21	-C20	119.2(3)	C18	-C19	-H19	119.1(6)
C3	-C4	-H4	119.8(3)	C20	-C19	-H19	119.1(6)
C5	-C4	-H4	119.8(3)	C19	-C20	-H20	120.4(5)
C4	-C5	-H5	119.3(4)	C21	-C20	-H20	120.4(5)
C6	-C5	-H5	119.5(4)	O22	-C23	-H23A	109.5(17)
C5	-C6	-H6	120.0(4)	O22	-C23	-H23B	109.4(16)
C7	-C6	-H6	120.0(4)	O22	-C23	-H23C	109.3(13)
C6	-C7	-H7	119.6(3)	H23A	-C23	-H23B	110(3)
C8	-C7	-H7	119.6(3)	H23A	-C23	-H23C	109(3)
C8	-C9	-H9	119.9(3)	H23B	-C23	-H23C	109.5(19)

5.5. Torsion Angles (Degrees)

O25A-Cu1-O13-C12	-99.9(2)	N2-C3-C8-C7	177.8(2)
N2-Cu1-O13-C12	-9.83(18)	N2-C3-C4-C5	-178.2(3)
O25A_a-Cu1-O13-C12	80.1(2)	C8-C3-C4-C5	4.2(4)

N2_a-Cu1-O13-C12	170.17(17)	N2-C3-C8-C9	-3.5(4)
O13-Cu1-O25A-C124	-61.3(5)	C4-C3-C8-C9	174.1(2)
N2-Cu1-O25A-C124	-142.3(5)	C4-C3-C8-C7	-4.6(4)
O13_a-Cu1-O25A-C124	118.7(5)	C3-C4-C5-C6	-0.7(5)
N2_a-Cu1-O25A-C124	37.7(5)	C4-C5-C6-C7	-2.5(5)
O13-Cu1-N2-C3	-179.5(2)	C5-C6-C7-C8	2.1(5)
O13-Cu1-N2-C11	10.38(16)	C6-C7-C8-C9	-177.1(3)
O25A-Cu1-N2-C3	-81.8(2)	C6-C7-C8-C3	1.4(4)
O25A-Cu1-N2-C11	108.1(2)	C3-C8-C9-C10	0.7(4)
O13_a-Cu1-N2-C3	0.5(2)	C7-C8-C9-C10	179.3(3)
O13_a-Cu1-N2-C11	-169.63(16)	C8-C9-C10-C11	1.9(4)
O25A_a-Cu1-N2-C3	98.2(2)	C9-C10-C11-C12	177.9(2)
O25A_a-Cu1-N2-C11	-71.9(2)	C9-C10-C11-N2	-1.8(4)
O26-C124-O25A-Cu1	-63.9(5)	N2-C11-C12-N14	-177.8(2)
O27A-C124-O25A-Cu1	158.0(6)	N2-C11-C12-O13	1.9(3)
O28-C124-O25A-Cu1	45.3(6)	C10-C11-C12-N14	2.4(4)
Cu1-O13-C12-N14	-172.63(19)	C10-C11-C12-O13	-177.9(2)
Cu1-O13-C12-C11	7.6(3)	N14-C15-C16-C21	-91.7(3)
C23-O22-C21-C20	0.4(5)	N14-C15-C16-C17	87.2(3)
C23-O22-C21-C16	-179.2(3)	C21-C16-C17-C18	-0.3(5)
C11-N2-C3-C8	3.7(3)	C15-C16-C21-O22	-0.8(4)
Cu1-N2-C11-C12	-9.3(3)	C15-C16-C17-C18	-179.2(4)
C3-N2-C11-C10	-1.0(4)	C15-C16-C21-C20	179.6(3)
Cu1-N2-C11-C10	170.5(2)	C17-C16-C21-C20	0.7(5)
Cu1-N2-C3-C8	-165.76(18)	C17-C16-C21-O22	-179.7(3)
C11-N2-C3-C4	-173.9(2)	C16-C17-C18-C19	-0.3(7)
C3-N2-C11-C12	179.2(2)	C17-C18-C19-C20	0.5(9)
Cu1-N2-C3-C4	16.7(3)	C18-C19-C20-C21	-0.1(8)
C15-N14-C12-O13	-1.4(4)	C19-C20-C21-O22	179.9(6)
C12-N14-C15-C16	-95.8(3)	C19-C20-C21-C16	-0.5(6)
C15-N14-C12-C11	178.3(2)		

6. L3

6.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

<u>Crystal Data</u>			
Empirical Formula		C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O	
Formula Weight		262.30	
Crystal System		Monoclinic	
Space group		<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	(No. 14)
a, b, c [Angstrom]	8.4260(10)	17.823(2)	9.4200(10)
alpha, beta, gamma [deg]	90	101.210(5)	90
V [Ang ³]			1387.7(3)
Z			4
D(calc) [g/cm ³]			1.255
F(000)			552
μ(CuKα) [/mm]			0.6
Crystal Size [mm]		0.20 x 0.35 x 0.50	
<u>Data Collection</u>			
Temperature (K)			293
Radiation [Angstrom]		CuKα	1.54178
Theta Min-Max [Deg]			5.0, 73.6
Dataset	-10: 0 ; -21: 21 ; -11: 11		
Tot., Uniq. Data, R(int)		5728, 2728, 0.015	

Observed data [$I > 2.0 \sigma(I)$]

2345

		<u>Refinement</u>			
Refinement method				on F^2	
Nref, Npar				2728, 186	
R, wR, S				0.0377, 0.1112, 1.05	
Max. and Av. Shift/Error				0.01, 0.00	
Min. and Max. resd. dens. [$e/\text{\AA}^3$]				-0.15, 0.20	

6.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [\AA^2]
----	---	---	---	-----
O11	0.48420(12)	0.31166(5)	0.83651(8)	0.0558(3)
N1	0.63310(11)	0.36944(5)	0.52691(10)	0.0421(3)
N13	0.47759(12)	0.25337(5)	0.62138(10)	0.0454(3)
C2	0.70536(13)	0.42931(6)	0.47305(12)	0.0438(3)
C3	0.75762(16)	0.42126(8)	0.33973(14)	0.0549(4)
C4	0.82872(18)	0.48019(9)	0.28254(16)	0.0660(5)
C5	0.85075(18)	0.54904(8)	0.35552(18)	0.0677(5)
C6	0.80397(17)	0.55823(7)	0.48395(17)	0.0612(4)
C7	0.73054(14)	0.49848(6)	0.54781(14)	0.0480(4)
C8	0.68181(16)	0.50350(7)	0.68233(15)	0.0551(4)
C9	0.61202(16)	0.44348(7)	0.73618(13)	0.0507(4)
C10	0.58944(13)	0.37739(6)	0.65351(11)	0.0409(3)
C12	0.51149(13)	0.31076(6)	0.71217(11)	0.0421(3)
C14	0.40286(14)	0.18450(6)	0.65960(13)	0.0469(3)
C15	0.22196(14)	0.18400(6)	0.61269(12)	0.0466(3)
C16	0.15027(18)	0.13564(10)	0.50675(15)	0.0677(5)
C17	-0.0152(2)	0.13487(13)	0.46359(18)	0.0891(7)
C18	-0.11055(19)	0.18292(12)	0.5248(2)	0.0870(7)
C19	-0.0407(2)	0.23059(11)	0.6319(2)	0.0906(8)
C20	0.12464(19)	0.23064(9)	0.6767(2)	0.0746(6)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

6.3. Bond Distances (\AA)

O11	-C12	1.2368(13)	C15	-C16	1.3672(19)
N1	-C2	1.3736(14)	C16	-C17	1.374(2)
N1	-C10	1.3222(14)	C17	-C18	1.375(3)
N13	-C12	1.3283(14)	C18	-C19	1.362(3)
N13	-C14	1.4563(15)	C19	-C20	1.375(2)
N13	-H13	0.886(16)	C3	-H3	0.9303
C2	-C3	1.4166(17)	C4	-H4	0.9296
C2	-C7	1.4152(16)	C5	-H5	0.9289
C3	-C4	1.370(2)	C6	-H6	0.9292
C4	-C5	1.401(2)	C8	-H8	0.9302
C5	-C6	1.353(2)	C9	-H9	0.9297
C6	-C7	1.4225(18)	C14	-H14A	0.9701
C7	-C8	1.4088(19)	C14	-H14B	0.9704
C8	-C9	1.3651(18)	C16	-H16	0.9304
C9	-C10	1.4045(16)	C17	-H17	0.9297
C10	-C12	1.5127(15)	C18	-H18	0.9299
C14	-C15	1.5023(17)	C19	-H19	0.9298
C15	-C20	1.385(2)	C20	-H20	0.9300

6.4. Bond Angles (Degrees)

C2	-N1	-C10	118.09(9)	C17	-C18	-C19	119.70(16)
C12	-N13	-C14	122.62(9)	C18	-C19	-C20	119.60(17)
C14	-N13	-H13	119.0(9)	C15	-C20	-C19	121.08(16)
C12	-N13	-H13	118.3(9)	C2	-C3	-H3	119.81
N1	-C2	-C7	121.82(10)	C4	-C3	-H3	119.79
N1	-C2	-C3	119.03(10)	C3	-C4	-H4	119.88
C3	-C2	-C7	119.15(11)	C5	-C4	-H4	119.80
C2	-C3	-C4	120.39(13)	C4	-C5	-H5	119.63
C3	-C4	-C5	120.31(14)	C6	-C5	-H5	119.65
C4	-C5	-C6	120.72(14)	C5	-C6	-H6	119.57
C5	-C6	-C7	120.91(12)	C7	-C6	-H6	119.52
C2	-C7	-C8	117.47(10)	C7	-C8	-H8	119.79
C2	-C7	-C6	118.50(12)	C9	-C8	-H8	119.79
C6	-C7	-C8	124.03(11)	C8	-C9	-H9	120.86
C7	-C8	-C9	120.43(11)	C10	-C9	-H9	120.92
C8	-C9	-C10	118.22(11)	N13	-C14	-H14A	108.94
C9	-C10	-C12	118.52(10)	N13	-C14	-H14B	108.97
N1	-C10	-C12	117.52(9)	C15	-C14	-H14A	108.94
N1	-C10	-C9	123.96(10)	C15	-C14	-H14B	108.91
O11	-C12	-C10	120.64(10)	H14A	-C14	-H14B	107.67
O11	-C12	-N13	124.29(10)	C15	-C16	-H16	120.00
N13	-C12	-C10	115.07(9)	C17	-C16	-H16	119.93
N13	-C14	-C15	113.27(9)	C16	-C17	-H17	119.66
C14	-C15	-C16	119.83(11)	C18	-C17	-H17	119.58
C16	-C15	-C20	118.75(13)	C17	-C18	-H18	120.17
C14	-C15	-C20	121.40(11)	C19	-C18	-H18	120.13
C15	-C16	-C17	120.07(15)	C18	-C19	-H19	120.23
C16	-C17	-C18	120.76(17)	C20	-C19	-H19	120.17
C15	-C20	-H20	119.47	C19	-C20	-H20	119.45

6.5. Torsion Angles (Degrees)

C10-N1-C2-C3	178.07(11)	C6-C7-C8-C9	180.0(4)
C10-N1-C2-C7	-1.24(16)	C7-C8-C9-C10	-0.47(19)
C2-N1-C10-C9	0.21(19)	C8-C9-C10-N1	0.65(19)
C2-N1-C10-C12	-179.42(10)	C8-C9-C10-C12	-179.73(11)
C14-N13-C12-O11	0.25(18)	N1-C10-C12-N13	-7.58(15)
C14-N13-C12-C10	179.81(11)	N1-C10-C12-O11	172.00(11)
C12-N13-C14-C15	94.44(13)	C9-C10-C12-O11	-7.64(17)
C3-C2-C7-C8	-177.93(12)	C9-C10-C12-N13	172.78(11)
C7-C2-C3-C4	-1.29(19)	N13-C14-C15-C20	-68.85(15)
N1-C2-C3-C4	179.38(13)	N13-C14-C15-C16	112.52(13)
C3-C2-C7-C6	1.63(17)	C14-C15-C16-C17	179.90(14)
N1-C2-C7-C6	-179.06(11)	C20-C15-C16-C17	1.2(2)
N1-C2-C7-C8	1.39(17)	C14-C15-C20-C19	179.13(15)
C2-C3-C4-C5	0.1(3)	C16-C15-C20-C19	-2.2(2)
C3-C4-C5-C6	0.7(2)	C15-C16-C17-C18	0.7(3)
C4-C5-C6-C7	-0.3(2)	C16-C17-C18-C19	-1.6(3)
C5-C6-C7-C2	-0.8(2)	C17-C18-C19-C20	0.6(3)
C5-C6-C7-C8	178.68(14)	C18-C19-C20-C15	1.3(3)
C2-C7-C8-C9	-0.49(19)		

7. C4

7.1. Crystal Data and Details of the Structure Determination

<u>Crystal Data</u>				
Formula	C ₁₆ H ₁₈ Cl Cu _{0.5} N ₂ O ₅			
Formula Weight	385.55			
Crystal System	Triclinic			
Space group	P-1 (No. 2)			
a, b, c [Angstrom]	8.7990(10)	9.6230(10)	11.0420(10)	
alpha, beta, gamma [deg]	71.614(6)	87.014(5)	69.283(7)	
V [Ang ³]	828.00(16)			
Z	2			
D(calc) [g/cm ³]	1.546			
μ(CuKα) [/mm]	2.969			
F(000)	399			
Crystal Size [mm]	0.09 x	0.28 x	0.33	
<u>Data Collection</u>				
Temperature (K)	293			
Radiation [Angstrom]	CuKα		1.54178	
Theta Min-Max [Deg]	4.2, 71.9			
Dataset	-8: 10 ; -11: 11 ; -13: 13			
Tot., Uniq. Data, R(int)	5305,	3244,	0.019	
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3009			
<u>Refinement</u>				
Refinement method	on F ²			
Nref, Npar	3244, 223			
R, wR2, S	0.0595,	0.1773,	1.03	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00			
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Anq ³]	-0.84, 0.88			

7.2. Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	----	----	----	-----
Cu1	1/2	1/2	0	0.0402(2)
Cl21	0.27113(12)	0.90809(10)	-0.13426(9)	0.0572(3)
O13	0.5011(3)	0.5731(3)	0.1439(2)	0.0454(7)
O22	0.3137(4)	0.7587(3)	-0.1504(3)	0.0768(11)
O23	0.4006(5)	0.9382(5)	-0.1034(8)	0.165(3)
O24	0.1796(9)	0.9047(7)	-0.0226(5)	0.155(3)
O25	0.1705(8)	1.0261(6)	-0.2298(5)	0.155(2)
N2	0.6952(3)	0.5753(3)	-0.0422(2)	0.0360(7)
N14	0.5765(3)	0.7359(3)	0.2125(3)	0.0461(8)
C3	0.8033(3)	0.5631(4)	-0.1369(3)	0.0393(8)
C4	0.8180(4)	0.4573(5)	-0.2045(4)	0.0561(11)
C5	0.9263(5)	0.4461(6)	-0.2983(4)	0.0655(14)
C6	1.0234(5)	0.5392(6)	-0.3280(4)	0.0659(14)
C7	1.0174(4)	0.6374(5)	-0.2620(4)	0.0580(11)
C8	0.9085(4)	0.6504(4)	-0.1623(3)	0.0442(9)
C9	0.9060(4)	0.7423(4)	-0.0855(4)	0.0515(10)
C10	0.8046(4)	0.7461(4)	0.0115(3)	0.0469(10)

C11	0.6993(3)	0.6625(3)	0.0284(3)	0.0359(8)
C12	0.5843(3)	0.6580(3)	0.1335(3)	0.0372(8)
C15	0.4689(4)	0.7382(4)	0.3193(3)	0.0496(10)
C16	0.3130(5)	0.8763(5)	0.2792(4)	0.0646(14)
C17	0.2042(6)	0.8887(6)	0.3910(5)	0.0765(17)
C18	0.2932(6)	0.8917(6)	0.5023(4)	0.0754(16)
C19	0.4478(7)	0.7535(8)	0.5428(4)	0.100(2)
C20	0.5581(6)	0.7391(6)	0.4335(4)	0.0791(16)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

7.3. Bond Distances (Angstrom)

Cu1	-O13	1.932(2)	C11	-C12	1.500(4)
Cu1	-O22	2.536(3)	C15	-C20	1.524(6)
Cu1	-N2	2.068(3)	C15	-C16	1.499(6)
Cu1	-O13_a	1.932(2)	C16	-C17	1.531(7)
Cu1	-O22_a	2.536(3)	C17	-C18	1.504(7)
Cu1	-N2_a	2.068(3)	C18	-C19	1.492(9)
C121	-O22	1.419(3)	C19	-C20	1.519(7)
C121	-O23	1.354(5)	C4	-H4	0.9301
C121	-O24	1.435(6)	C5	-H5	0.9301
C121	-O25	1.348(6)	C6	-H6	0.9296
O13	-C12	1.254(4)	C7	-H7	0.9303
N2	-C3	1.381(4)	C9	-H9	0.9296
N2	-C11	1.323(4)	C10	-H10	0.9303
N14	-C12	1.303(4)	C15	-H15	0.9802
N14	-C15	1.474(5)	C16	-H16A	0.9702
N14	-H14	0.8596	C16	-H16B	0.9703
C3	-C4	1.410(6)	C17	-H17A	0.9704
C3	-C8	1.420(5)	C17	-H17B	0.9694
C4	-C5	1.374(6)	C18	-H18A	0.9700
C5	-C6	1.403(7)	C18	-H18B	0.9695
C6	-C7	1.350(7)	C19	-H19A	0.9700
C7	-C8	1.428(5)	C19	-H19B	0.9710
C8	-C9	1.400(5)	C20	-H20A	0.9698
C9	-C10	1.359(5)	C20	-H20B	0.9700
C10	-C11	1.398(5)			

7.4. Bond Angles (Degrees)

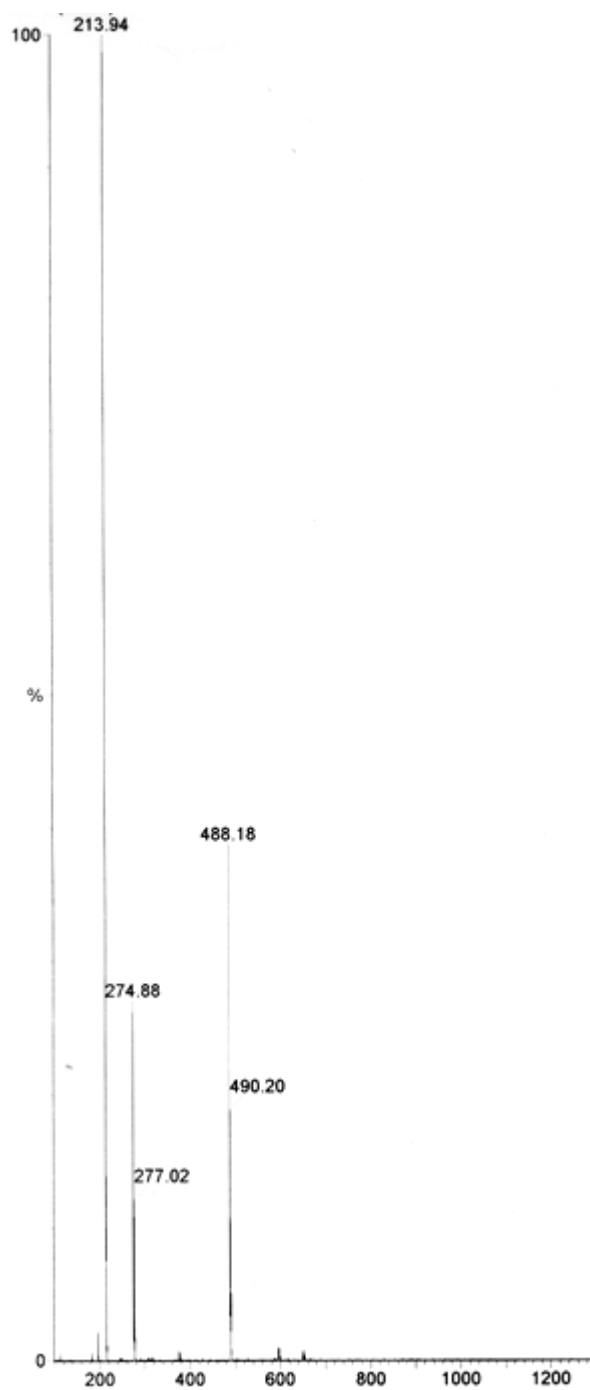
O13	-Cu1	-O22	96.57(10)	C15	-N14	-H14	117.56
O13	-Cu1	-N2	81.11(10)	N2	-C3	-C4	120.7(3)
O13	-Cu1	-O13_a	180.00	N2	-C3	-C8	120.3(3)
O13	-Cu1	-O22_a	83.43(10)	C4	-C3	-C8	118.9(3)
O13	-Cu1	-N2_a	98.89(10)	C3	-C4	-C5	120.1(4)
O22	-Cu1	-N2	90.00(11)	C4	-C5	-C6	120.7(5)
O13_a	-Cu1	-O22	83.43(10)	C5	-C6	-C7	120.9(4)
O22	-Cu1	-O22_a	180.00	C6	-C7	-C8	120.1(4)
O22	-Cu1	-N2_a	90.00(11)	C3	-C8	-C7	119.1(3)
O13_a	-Cu1	-N2	98.89(10)	C3	-C8	-C9	118.7(3)
O22_a	-Cu1	-N2	90.00(11)	C7	-C8	-C9	122.1(4)
N2	-Cu1	-N2_a	180.00	C8	-C9	-C10	119.9(3)
O13_a	-Cu1	-O22_a	96.57(10)	C9	-C10	-C11	118.6(3)
O13_a	-Cu1	-N2_a	81.11(10)	C10	-C11	-C12	122.6(3)
O22_a	-Cu1	-N2_a	90.00(11)	N2	-C11	-C12	113.4(3)
O22	-C121	-O23	113.5(3)	N2	-C11	-C10	124.0(3)

O22	-C121	-O24	107.0(3)	O13	-C12	-N14	122.1(3)
O22	-C121	-O25	113.9(3)	O13	-C12	-C11	117.3(3)
O23	-C121	-O24	102.9(5)	N14	-C12	-C11	120.6(3)
O23	-C121	-O25	113.4(4)	N14	-C15	-C16	110.7(3)
O24	-C121	-O25	104.9(4)	C16	-C15	-C20	111.6(4)
Cu1	-O13	-C12	115.1(2)	N14	-C15	-C20	109.4(3)
Cu1	-O22	-C121	126.45(19)	C15	-C16	-C17	111.8(4)
Cu1	-N2	-C3	130.9(2)	C16	-C17	-C18	111.4(4)
Cu1	-N2	-C11	110.3(2)	C17	-C18	-C19	111.3(5)
C3	-N2	-C11	118.4(3)	C18	-C19	-C20	112.5(4)
C12	-N14	-C15	124.8(3)	C15	-C20	-C19	111.3(4)
C12	-N14	-H14	117.63	C3	-C4	-H4	119.93
C5	-C4	-H4	119.94	C16	-C17	-H17B	109.42
C4	-C5	-H5	119.67	C18	-C17	-H17A	109.30
C6	-C5	-H5	119.66	C18	-C17	-H17B	109.32
C5	-C6	-H6	119.51	H17A	-C17	-H17B	107.96
C7	-C6	-H6	119.57	C17	-C18	-H18A	109.37
C6	-C7	-H7	119.99	C17	-C18	-H18B	109.32
C8	-C7	-H7	119.93	C19	-C18	-H18A	109.37
C8	-C9	-H9	120.01	C19	-C18	-H18B	109.35
C10	-C9	-H9	120.07	H18A	-C18	-H18B	108.06
C9	-C10	-H10	120.67	C18	-C19	-H19A	109.17
C11	-C10	-H10	120.74	C18	-C19	-H19B	109.07
N14	-C15	-H15	108.36	C20	-C19	-H19A	109.12
C16	-C15	-H15	108.38	C20	-C19	-H19B	109.06
C20	-C15	-H15	108.41	H19A	-C19	-H19B	107.86
C15	-C16	-H16A	109.25	C15	-C20	-H20A	109.39
C15	-C16	-H16B	109.24	C15	-C20	-H20B	109.34
C17	-C16	-H16A	109.25	C19	-C20	-H20A	109.34
C17	-C16	-H16B	109.30	C19	-C20	-H20B	109.41
H16A	-C16	-H16B	107.93	H20A	-C20	-H20B	107.98
C16	-C17	-H17A	109.35				

7.5. Torsion Angles (Degrees)

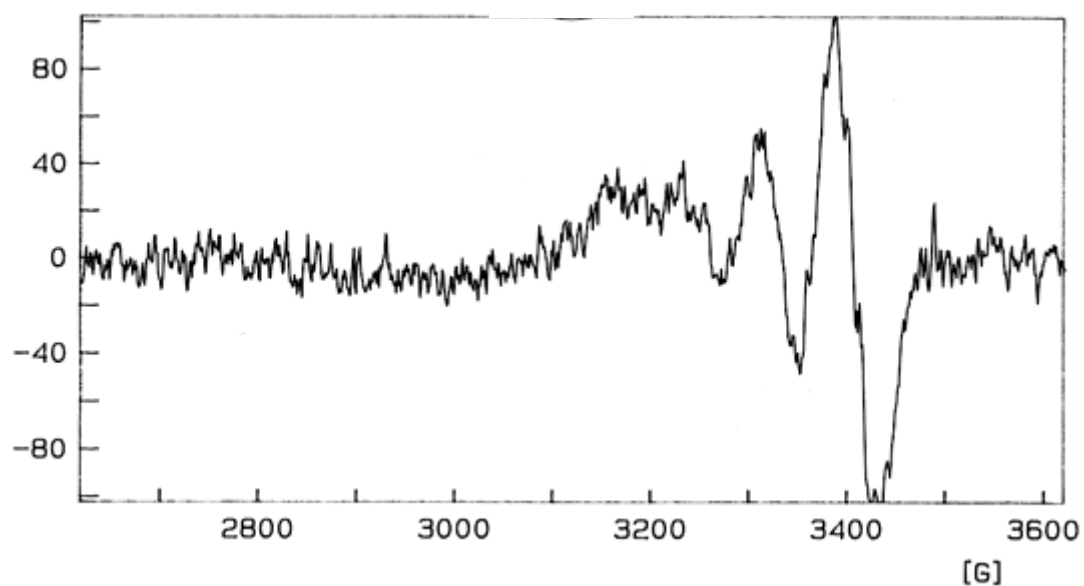
O22-Cu1-O13-C12	-74.2(2)	C12-N14-C15-C16	-94.4(4)
N2-Cu1-O13-C12	14.8(2)	C12-N14-C15-C20	142.3(4)
O22_a-Cu1-O13-C12	105.8(2)	N2-C3-C8-C9	3.2(5)
N2_a-Cu1-O13-C12	-165.2(2)	C4-C3-C8-C7	4.7(5)
O13-Cu1-O22-C121	14.7(3)	C4-C3-C8-C9	-173.1(4)
N2-Cu1-O22-C121	-66.3(3)	N2-C3-C4-C5	-179.9(4)
O13_a-Cu1-O22-C121	-165.3(3)	C8-C3-C4-C5	-3.6(6)
N2_a-Cu1-O22-C121	113.7(3)	N2-C3-C8-C7	-179.1(3)
O13-Cu1-N2-C3	174.2(3)	C3-C4-C5-C6	0.0(7)
O13-Cu1-N2-C11	-13.6(2)	C4-C5-C6-C7	2.6(7)
O22-Cu1-N2-C3	-89.2(3)	C5-C6-C7-C8	-1.5(7)
O22-Cu1-N2-C11	83.0(2)	C6-C7-C8-C3	-2.2(6)
O13_a-Cu1-N2-C3	-5.8(3)	C6-C7-C8-C9	175.5(4)
O13_a-Cu1-N2-C11	166.4(2)	C7-C8-C9-C10	-177.4(4)
O22_a-Cu1-N2-C3	90.8(3)	C3-C8-C9-C10	0.3(6)
O22_a-Cu1-N2-C11	-97.0(2)	C8-C9-C10-C11	-2.8(5)
O23-C121-O22-Cu1	47.8(5)	C9-C10-C11-N2	2.1(5)
O24-C121-O22-Cu1	-65.0(4)	C9-C10-C11-C12	179.3(3)
O25-C121-O22-Cu1	179.5(4)	C10-C11-C12-N14	1.4(5)
Cu1-O13-C12-N14	168.9(2)	C10-C11-C12-O13	-176.5(3)
Cu1-O13-C12-C11	-13.3(4)	N2-C11-C12-O13	1.0(4)
Cu1-N2-C3-C4	-16.1(5)	N2-C11-C12-N14	178.8(3)
Cu1-N2-C3-C8	167.7(2)	N14-C15-C16-C17	-175.7(4)
C11-N2-C3-C4	172.3(3)	C16-C15-C20-C19	53.1(5)

C11-N2-C3-C8	-3.9(5)	C20-C15-C16-C17	-53.7(5)
Cu1-N2-C11-C10	-172.0(3)	N14-C15-C20-C19	175.8(4)
Cu1-N2-C11-C12	10.6(3)	C15-C16-C17-C18	54.7(6)
C3-N2-C11-C10	1.3(5)	C16-C17-C18-C19	-54.9(6)
C3-N2-C11-C12	-176.1(3)	C17-C18-C19-C20	55.1(7)
C15-N14-C12-O13	-1.7(5)	C18-C19-C20-C15	-54.0(7)
C15-N14-C12-C11	-179.5(3)		

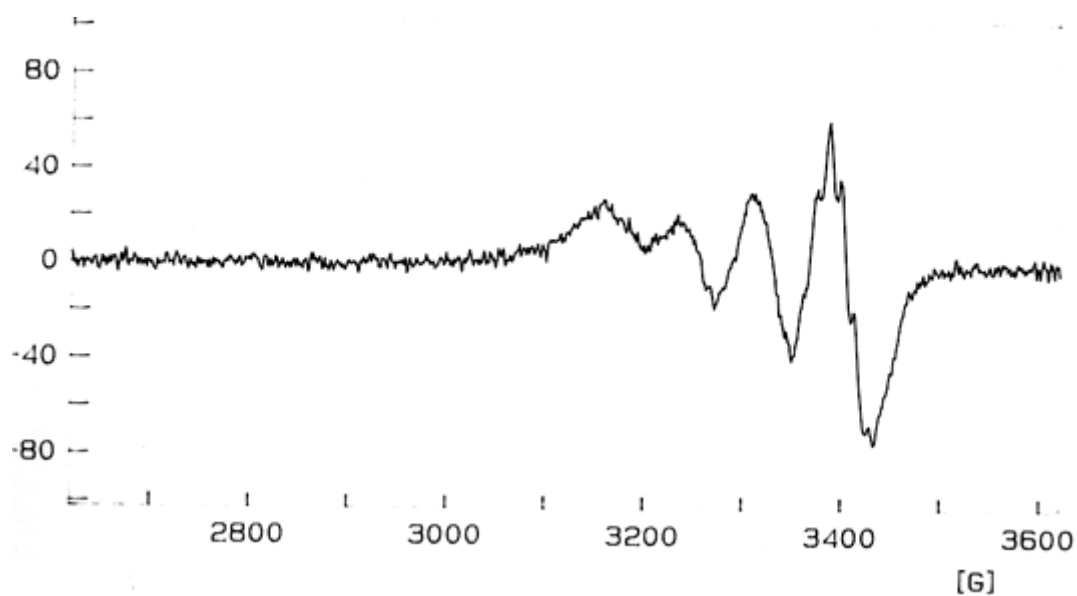
ANNEXE B : Spectre ESI-MSC01

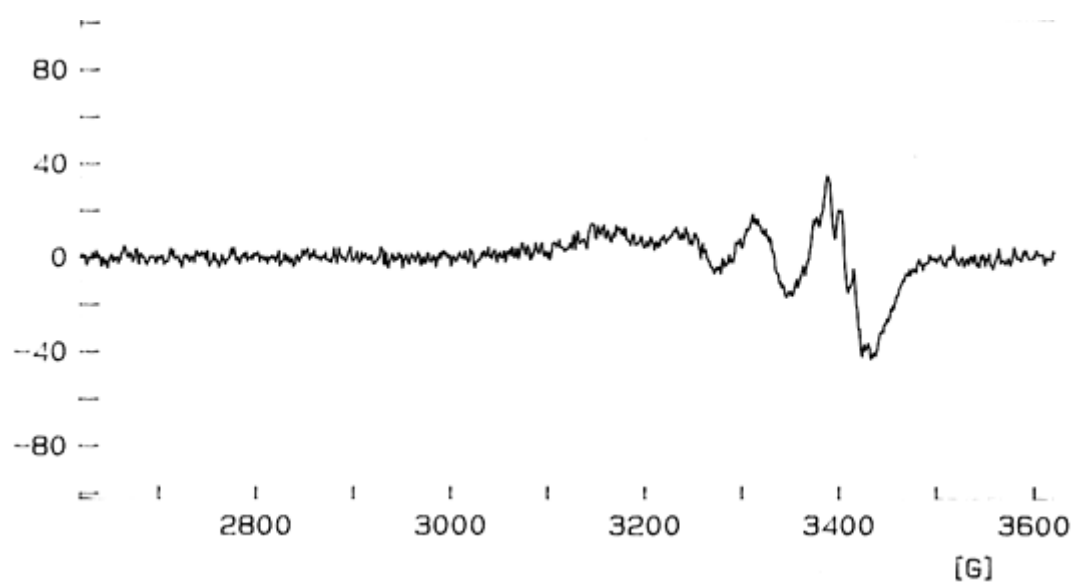
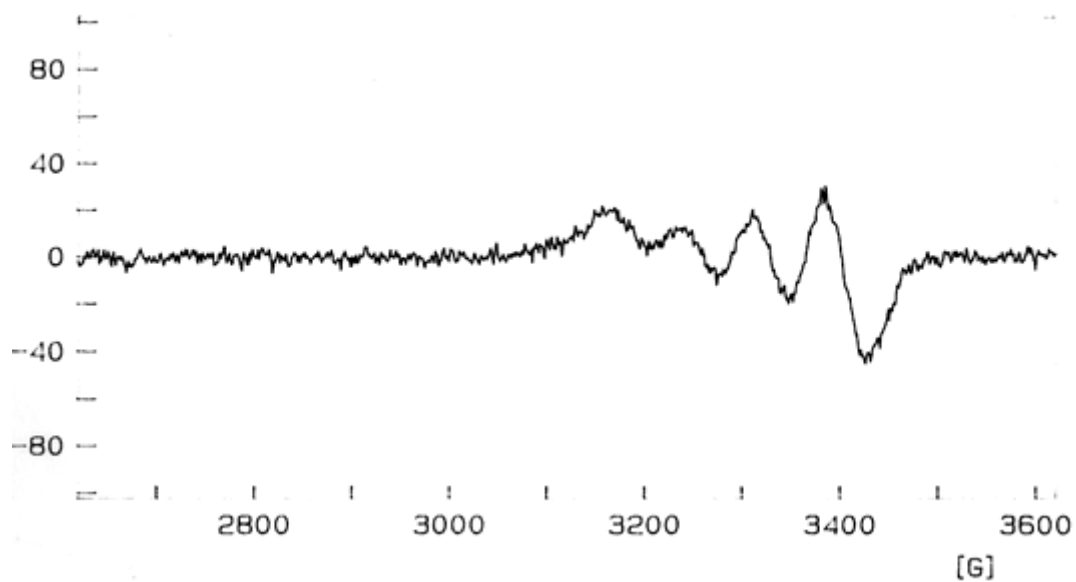
ANNEXE C : Spectres RPE

1. SETCEZ en solution dans le tampon acétate (pH = 5.5)



2. C01 en solution dans du méthanol



3. C01 en solution dans le tampon acétate (pH = 5.5)4. C02 en solution dans du méthanol

5. C02 en solution dans le tampon acétate (pH = 5.5)